

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Exprese a purifikace kinasové domény ASK1 kinasy

Expression and purification of kinase domain of ASK1 kinase

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Praha 2010

Bc. Hana Bártová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 25. dubna 2010.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za odborné rady. Mgr. Petru Váchovi za uvedení do problematiky purifikace proteinů, ochotu pomoci, stálou vstřícnost a strávený čas. Dále děkuji RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za trpělivost. Také děkuji svým rodičům za neustálou podporu ve všech směrech.

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo nalezení optimálních podmínek pro expresi ASK1 kinasy v prokaryotním expresním systému a vývoj purifikačního protokolu umožňujícího přípravu miligramových množství stabilního a rozpustného proteinu. Byly otestovány různé podmínky exprese v bakteriích *E. coli* s různou teplotou exprese, složením kultivačního média či momentu provedení indukce. Při přípravě purifikačního protokolu byly testovány různé metody purifikace proteinů. Finální protokol je založen na kombinaci chelatační chromatografie a následné gelové permeační chromatografie. Výsledkem diplomové práce je protokol umožňující přípravu 1 mg čisté kinasy ASK1 z 1 litru média.

Abstract

The goal of this diploma thesis was to find optimal conditions for expression of ASK1 kinase in prokaryotic expression system and to optimize purification protocol which enables preparing of milligram amounts of stable and soluble protein. Different conditions of expression were tested in *E. coli* cells including temperature of expression, cultivation medium or the length of induction. Different methods of purification were tested during the development of the purification protocol. The final protocol is based on chelate chromatography followed by gel permeation chromatography. The result of the diploma thesis is a protocol that allows preparing 1 mg of pure ASK1 kinase from 1 liter of medium.

Obsah

Abstrakt.....	4
Obsah	5
Použité zkratky.....	7
1. Úvod.....	10
2. Přehled literatury.....	11
2.1. <i>Struktura a funkce ASK1 kinasy</i>	11
2.2. <i>Struktura a funkce proteinů 14-3-3</i>	12
2.2.1. Objev a název.....	13
2.2.2. Výskyt rodiny 14-3-3 a konzervace sekvence	14
2.2.3. Struktura 14-3-3 dimerů a jejich interakce	14
2.2.4. Vazebný motiv 14-3-3	15
2.2.5. Fosforylace 14-3-3 isoform.....	17
2.3. <i>Interakce ASK1 kinasy s proteiny 14-3-3</i>	19
2.4. <i>ASK1 kinasa a regulace oxidativním stresem</i>	20
2.5. <i>Regulační dráhy MAP kinas</i>	21
2.6. <i>Regulace apoptosy vyvolané oxidativním stresem</i>	22
3. Metody	25
3.1 <i>Materiál</i>	25
3.1.1. Chemikálie	25
3.1.2. Přístrojové vybavení	26
3.1.3. Ostatní materiál	26
3.2. <i>Expres kinasy ASK1</i>	27
3.2.1 Transformace	27
3.2.2. Kultivace bakterií.....	27
3.2.3. Sonikace.....	28
3.2.4. Test rozpustnosti	29
3.3. <i>Purifikace proteinů</i>	29
3.3.1. Niklová chelatační chromatografie	29
3.3.2. Test vazby na matrici	30
3.3.3. Dialýza	31
3.3.4. Aniontová-výměnná chromatografie	31
3.3.5. Gelová permeační chromatografie.....	32
3.4. <i>Odštěpení histidinové kotvy thrombinem</i>	32
3.5. <i>Test stability</i>	32
3.6. <i>Stanovení koncentrace proteinu - metoda Bradfordové</i>	33
3.7. <i>SDS-PAGE</i>	33
4. Cíl práce	35
5. Výsledky	36
5.1. <i>Expresní konstrukt</i>	36
5.2. <i>Expres I</i>	36
5.2.1. Test exprese	36
5.2.2. Test rozpustnosti	37
5.3. <i>Expres II</i>	38
5.3.1. Test exprese	38

5.3.2. Test rozpustnosti	38
5.3.3. Test afinity	39
5.4. <i>Exprese III</i>	40
5.5. <i>Exprese IV</i>	41
5.6. <i>Exprese V</i>	42
5.7. <i>Purifikace I</i>	43
5.7.1. Niklová chelatační chromatografie	43
5.7.2. Aniontová-výměnná chromatografie	43
5.8. <i>Purifikace II</i>	44
5.8.1. Niklová chelatační chromatografie	44
5.8.2. Gelová permeační chromatografie	45
5.9. <i>Purifikace III</i>	46
5.9.1. Niklová chelatační chromatografie	46
5.9.2. Gelová permeační chromatografie	47
5.10. <i>Purifikace IV</i>	49
5.10.1. Niklová chelatační chromatografie	49
5.10.2. Gelová permeační chromatografie	50
5.11. <i>Test stability</i>	51
5.13. <i>Štěpení thrombinem</i>	52
6. Diskuze	53
7. Závěr	55
8. Přílohy	56
8.1. <i>Příloha 1</i>	56
8.2. <i>Příloha 2</i>	61
9. Literatura	62

Použité zkratky

AANAT	arylalkylamin N-acetyltransferasa
AKAP-Lbc	protein ukotvující A kinasu – protein „lymphoid blast crisis“
AKT	homolog myšího thymomového virového onkogenu v-akt
APS	persíran amonný
ASK1	kinasa regulující signály apoptosy 1
BAD	protein „Bcl-2-associated death promoter“
Bcr-Abl	protein „breakpoint cluster region“ - kinasa související s Abelsonovou myší leukémií
BL21 (DE3)	kmen <i>Escherichia coli</i>
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCC	C koncová šroubovicová doména
Cdc25A	fosfatasa „cell division cycle“ 25A
CJD	Creutzfeld-Jakobova nemoc
CKI α	kaseinkinasa 1 α
CML	chronická myelogenní leukémie
CV	objem kolony
Daxx	protein související s „death“ doménou
DEAE	diethylaminoethyl
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	kinasa regulující extracelulární signály
FKBP	protein vázající FK506
GPCR	receptor G-proteinu
GSTp	glutathion S-transferasa fosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Hsp 72	„heat-shock“ protein 72
IPTG	isopropyl- β -D-thio-galaktosid
JNK	c-Jun N-koncová kinasa
KC	keratinocyt
kDa	kiloDalton

KSR	kinasa „suppressor of activated Ras“
LB	lysogenní medium
LPS	liposacharid
MAP	mitogenně aktivovaná proteinkinasa
MAP3K	mitogenně aktivovaná proteinkinasa kinasy kinasy
MAPKAP-K	proteinkinasa aktivovaná MAP kinasou
MAPKKK5	mitogenně aktivovaná proteinkinasa kinasy kinasy 5
MEKK5	mitogenně aktivovaná proteinkinasa kinasy kinasy 5
MKK	MAP kinasa kinasy
Mr	relativní molekulová hmotnost
NCC	N koncová šroubovicová doména
PAK	proteinkinasa 1 aktivovaná p21
pET15b	plasmid pro expresi proteinů v bakteriích
PI3K	fosfatidylinositol 3 kinasa
PKA	proteinkinasa A
PKB	proteinkinasa B
PKC	proteinkinasa C
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	proteinfosfatasa 2A
PP5	proteinfosfatasa 5
Raf	homolog myšího virového onkogenu leukémie v-raf-1
RhoGef	protein „rhodopsin-guanine nucleotide exchange factor“
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku
Rpm	počet otáček za minutu
RSK	proteinkinasa aktivovaná Ras-mitogenem
SAPK	proteinové kinasy aktivované stresem
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným
SMG	protein „homolog Smg“

TB	terrific medium
TEMED	tetramethylethyldiamin
TNF	faktor nádorové nekrosy
TPR	tetratrikopeptidové opakování
TRAF	faktor asociovaný s TNF receptorem
Trx	thioredoxin
UV	ultrafialové záření
λ	vlnová délka

1. Úvod

Tato diplomová práce se zabývá vývojem expresního a purifikačního protokolu vybraného konstruktu ASK1 kinasy. Zkoumá optimální podmínky pro jeho expresi a purifikaci ve stabilní formě a s dostatečným výtěžkem. Vznikla pod vedením doc. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D, jehož výzkumná skupina se dlouhodobě věnuje studiu struktury a funkce proteinů 14-3-3. Kinasa ASK1 byla vybrána, protože je významným vazebným partnerem proteinů 14-3-3. V tomto ohledu tato diplomová práce navazuje na mojí bakalářskou práci s názvem Přehled současných znalostí o struktuře a funkci proteinů 14-3-3.

Spolehlivý purifikační protokol pro purifikaci kinasy ASK1 umožní získávání kinasy ASK1 a dalších konstruktů pro následující studie s isoformami 14-3-3. Mezi tyto plánované studie patří charakterizace komplexu ASK1 kinasy s 14-3-3, určení strukturních změn ovlivněných touto vazbou a vytvoření realistického 3D modelu komplexu ASK1 kinasy a proteinu 14-3-3. Základ této diplomové práce vychází z protokolu pro purifikaci proteinů 14-3-3, postupnými změnami podmínek dochází k přizpůsobení protokolu fyzikálně-chemickým specifikům proteinkinasy ASK1. Proteiny 14-3-3 ovlivňují proapoptotickou funkci ASK1 kinasy, a to tak, že apoptosa vyvolávaná ASK1 kinasou je v jejich přítomnosti potlačena. Tento mechanismus probíhá na principu řízení vnitrobuněčné distribuce ASK1 kinasy a modulace její aktivity. Změna lokace probíhá z cytoplazmy do perinukleárního prostoru¹.

Hlavními funkcemi ASK1 kinasy jsou reakce na buněčný stres a imunitní odpověď². Přímo fosforylací aktivuje dráhu MAP kinas kinas. ASK1 kinasa je aktivována liposacharidy (LPS), oxidativním stresem, stresem endoplazmatického retikula, příjmem vápenatých iontů, cytokiny, Fas ligandem, GPCR agonisty^{3,4,5} a některými chemoterapeutiky¹. Je také spojována s řadou nemocí, jako je například Huntingtonova choroba. ASK1 kinasa byla také předmětem výzkumu v léčbě maligního fibroidního histiocytomu, což je částečně agresivní forma nerozvinutého liposarkomu⁶. Další onemocnění spojované s funkcí ASK1 kinasy je Alzheimerova nemoc. V tomto případě probíhá aktivace kinasy ASK1 reaktivními formami kyslíku (ROS)^{7,8,9}.

Lidská ASK1 kinasa je polypeptid o velikosti 1374 aminokyselin, skládá se z kinasové domény a N a C konce s vysokým obsahem helikální sekundární struktury. Významnou součástí její struktury je také vazebné místo pro proteiny 14-3-3.

2. Přehled literatury

2.1. Struktura a funkce ASK1 kinasy

ASK1 kinasa (apoptosis signal-regulating kinase 1, synonyma – MAPKKK5, MAP3K5, MEKK5) patří do skupiny mitogenně aktivovaných proteinkinasy kinasy (MAP3K)¹⁰. ASK1 kinasa byla identifikována v roce 1996 jako jeden z proteinů intracelulární signální dráhy, kaskády mitogenně aktivovaných proteinových kinas. Jedná se o evolučně velmi dobře konzervovanou dráhu vyskytující se ve všech eukaryotických buňkách. Jejími hlavními funkcemi jsou reakce na buněčný stres a imunitní odpověď². Tato kinasa aktivuje přímou fosforylací MAP kinas kinas signální dráhu JNK (c-Jun N-koncová kinasa) a p38. ASK1 kinasu aktivují různé podněty, patří mezi ně liposacharidy (LPS), oxidativní stres, stres endoplazmatického retikula, příjem vápenatých iontů, cytokiny, Fas ligand, GPCR agonisté^{3,4,5} a chemoterapeutika (cisplatina, taxol)¹. ASK1 kinasa je spojována s řadou nemocí. Mezi ně patří například polyglutaminové onemocnění (PolyQ), způsobující několik dědičných neurodegenerativních onemocnění, jako je například Huntingtonova choroba. V průběhu této choroby se v cytoplasmě nebo v jádru buňky hromadí a agregují polypeptidy PolyQ fragmenty a zapříčiňují tak buněčný stres vedoucí k buněčné smrti nervové buňky. Tato buněčná smrt probíhá způsobem závislým na ASK1 kinase^{11,12,13}. ASK1 kinasa byla předmětem výzkumu v léčbě maligního fibroidního histiocytomu, což je částečně agresivní forma nerozvinutého liposarkomu⁶. ASK1 kinasa také ovlivňuje klíčový mechanismus β -amyloidové neurotoxicity u Alzheimerovy nemoci. Při této nemoci je ASK1 kinasa aktivována reaktivními formami kyslíku (ROS)^{7,8,9}.

Lidská ASK1 kinasa je polypeptid o velikosti 1374 aminokyselin, skládá se ze serin/threoninové kinasové domény a její N a C konce se vyznačují vysokým obsahem helikální sekundární struktury. ASK1 kinasa interaguje s řadou vazebných partnerů a tvoří tak vazebné komplexy s velkou molekulovou hmotností (přibližně 1500-2000 kDa)^{14,15}. V klidovém stavu tvoří homodimer stabilizovaný C koncovou doménou. N konec je přitom vázaný na redoxně regulovaný protein thioredoxin (Trx), který zabraňuje aktivaci ASK1 kinasy. Oxidativní stres vede ke tvorbě disulfidických můstků na thioredoxinu a k disociaci ASK1 kinasy^{16,17,18}. Disociace způsobí změnu konformace ASK1 kinasy a fosforylací aktivačního místa Thr838 a to buď autofosforylací nebo transfosforylací jinou kinasou¹⁴.

Aktivovaná ASK1 kinasa přímo fosforyluje MKK3/MKK6 a MKK4/MKK7, tím aktivuje dráhy p38 a JNK MAPK. MKK mají na C konci vazebnou DVD (dual variable domain) doménu, která se skládá z 24 aminokyselin, ta pravděpodobně interaguje s ASK1 kinasou a tím ovlivňuje specifické cílení MKK¹⁹.

2.2. *Struktura a funkce proteinů 14-3-3*

Rodina proteinů 14-3-3 je v současnosti intenzivně studována. Důkazem toho je, že nové publikace se objevují téměř každý den. Tyto proteiny jsou všudypřítomné a velmi důležité. Vyskytují se napříč celou eukaryotickou říší, jsou zapojeny v buněčné signalizaci, regulaci buněčného cyklu, intracelulárním transportu, struktuře cytoskeletu a transkripci²⁰. Ovlivňují rakovinné bujení a hrají roli při apoptose. Vyskytují se také při různých onemocněních, jako jsou Creutzfeld-Jakobova nemoc (CJD)^{21,22,23}, Alzheimerova²⁴, Parkinsonova²⁵ a Huntingtonova nemoc^{22,26,27}. Jejich strukturním specifickým je tvorbou dimerů. Velká pozornost se věnuje posttranslačním modifikacím, zvláště pak fosforylacím. V současnosti se výzkumné skupiny snaží o poskytnutí uceleného přehledu nejenom o jejich struktuře, ale také o vlivu fosforylace na jejich strukturu a funkci.

Rodinu proteinů 14-3-3 tvoří skupina vysoce konzervovaných kyselých proteinů o hmotnosti 30 kDa, vyskytujících se v širokém spektru organismů a tkání. Pět hlavních 14-3-3 isoform pochází z mozku savců a jsou pojmenovány α - η , toto pojmenování vzniklo z jejich příslušného pořadí při eluci na HPLC^{28,29}. Isoformy α a δ jsou fosforylované isoformy β a ζ ²⁹. Expresí dalších isoform τ (také známá jako θ) a σ probíhá v T buňkách a buňkách epitelu, ačkoli τ je často exprimována i v jiných tkáních včetně mozku. Nyní názvem „proteiny 14-3-3“ označujeme rodinu dimerních proteinů, která je schopna modulovat interakce mezi proteiny (včetně onkogenních produktů polyoma middle T, Raf-1, AKT a Bcr-Abl). U vazebných partnerů proteinů 14-3-3 se v mnoha případech ukázala výrazná preference k určité isoformě 14-3-3. Jednotlivé isoformy mohou tvořit jak homodimery, tak i heterodimery. Tato vlastnost pak může mít podstatný vliv na interakci s vazebnými partnery. Regulace vazebných interakcí je dosti komplexní, zahrnuje fosforylaci zúčastněného proteinu a někdy může být tato interakce modulovaná i fosforylací samotných 14-3-3 isoform.

2.2.1. Objev a název

Početná rodina proteinů 14-3-3, vyskytující se v mozku savců, dostala své jméno podle své specifické eluční a migrační stopy na dvourozměrné chromatografii s DEAE-celulosou a podle migrační stopy na škrobové gelové elektroforéze³⁰. Při analýze homogenátu z hovězího mozku se proteiny 14-3-3 na koloně s DEAE-celulosou vylučovaly ve čtrnácté frakci a v dalším kroku ve frakci 3.3. Časem byly proteiny 14-3-3 znovu objevovány dalšími vědci a tak zástupci této rodiny dostali mnoho dalších jmen. Tato jména vznikla popisem jejich zapojení v nových regulačních rolích. První funkce připisovaná rodině proteinů 14-3-3 byla aktivace tyrosinhydroxylasy a tryptofanhydroxylasy, což jsou enzymy limitující rychlost biosyntézy katecholaminových neurotransměčů a serotoninu³¹. Následně se ukázalo, že 14-3-3 regulují (inhibují) aktivitu proteinkinasy C^{32,33}. Další interakce s kinasou byla interakce 14-3-3 τ s proteinkinasy c-Bcr a Bcr-Abl³⁴. Výsledky této práce ukázaly, že 14-3-3 τ byl substrátem pro Bcr serin/threoninkinasy a také byl fosforylován na tyrosinu pomocí kinasy Bcr-Abl. Poté vyšlo najevo, že 14-3-3 isoformy jsou schopny interagovat s velkým počtem proteinkinasy včetně Raf^{35,36,37,38,39,40}.

V polovině devadesátých let začalo vycházet mnoho publikací ukazujících, že proteiny 14-3-3 by mohli vzájemně interagovat s množstvím proteinkinasy, fosfatasy a ostatních signálních proteinů. Byly publikovány také práce o jejich možné schopnosti vázat se na různé signální proteiny každou podjednotkou dimeru zvlášť jako nový typ „adaptérových proteinů“. Kromě interakcí 14-3-3 isoformy s různými proteiny byla popsána i interakce s tzv. křížovou DNA⁴¹ a regulace iniciace replikace DNA. Následně byly proteinům 14-3-3 připisovány enzymatické aktivity různé významnosti, ale žádná z nich v průběhu času neobstála. Interakce se 14-3-3 byla prokázána u více než 200 proteinů a jejich seznam se rozrůstá téměř každý den^{42,43,44,45}. Isoformy 14-3-3 jsou zapojeny v komplexech přítomných u řady neurodegenerativních poruch včetně Creutzfeld-Jakobovy nemoci (CJD)^{21,22,23}, Alzheimerovy²⁴, Parkinsonovy²⁵ a Huntingtonovy nemoci^{22,26,27}. Isoformy 14-3-3 jsou rovněž zapojeny ve velkých komplexech, které napomáhají efektivnímu šíření signálu v buňkách. Patří k nim např. regulace interakcí proteinu KSR^{46,47}, nebo regulace interakcí proteinů AKAP-Lbc a RhoGEF⁴⁸.

2.2.2. Výskyt rodiny 14-3-3 a konzervace sekvence

Rodina 14-3-3 je vysoce konzervovaná u mnoha druhů savců. Jednotlivé isoformy β , ϵ , η , γ , τ (také pojmenovaná θ), ζ a σ jsou téměř identické, a přesto obsahují pár rozdílných úseků. Proteiny 14-3-3 byly nalezeny zatím ve všech studovaných eukaryotických organismech^{49,50}. Více (aspoň dvě) 14-3-3 isoformy bylo pozorováno v téměř každém známém eukaryotickém organismu⁵¹. V *Arabidopsis*⁵⁰ probíhá exprese nejméně dvanácti (nejspíše až patnácti) isoform. U všech isoform kromě σ byla potvrzena acetylace na N konci savčích 14-3-3 isoform a to s odstraněním nebo bez odstranění aminokyseliny Met⁵². Toto zjištění je ve shodě s konsensem pro úpravu proteinů na N konci⁵³. V projektech sekvenace genomů nebyly identifikovány žádné známky nových lidských nebo myších 14-3-3 isoform.

Proteiny 14-3-3 jsou svojí sekvencí a strukturou jedinečné a podstatně se liší od ostatních známých proteinových rodin. Jediná homologie s ostatními proteiny se objevuje u helixů s tetratrikopeptidovým opakováním (TPR), které byly poprvé pozorovány ve struktuře proteinfosfatasy 5⁵⁴. TPR je degenerovaná sekvence 34 aminokyselin identifikovaná u řady proteinů, kde je přítomna v tandemových seskupeních tří až šestnácti motivů. TPR tak tvoří kostru, která může např. zprostředkovávat různé protein-proteinové interakce v multiproteinových komplexech. Strukturní studie o proteinu SMG7, obsahujícím TPR doménu, ukázaly, že tento protein je adaptér podobný 14-3-3⁵⁵.

2.2.3. Struktura 14-3-3 dimerů a jejich interakce

První 14-3-3 struktury byly definované pro τ a ζ isoformy^{56,57}. Ukázalo se, že to jsou vysoce α -helikální dimerní proteiny. Každý monomer se skládá z devíti antiparalelních α -helixů uspořádaných v N koncové a C koncové doméně. Dimer tvoří velký negativně nabitý kanál. Vnitřek tohoto kanálu tvoří oblasti, jejichž sekvence je neměnná u všech isoform. Na povrchu molekuly proteinu 14-3-3 se pak nacházejí oblasti, jejichž sekvence jsou proměnné. Kanál obsahující konzervované zbytky proto rozpoznává pouze společné rysy cílových proteinů, zatímco proměnný vnější povrch ovlivňuje specifickou interakci jednotlivých 14-3-3 isoform.

2.2.4. Vazebný motiv 14-3-3

Muslin a kol.⁵⁸ prokázali, že motiv obsahující fosfoserin, původně identifikovaný u Raf kinasy, je důležitý pro interakci s proteiny 14-3-3. Dále demonstrovali, že fosforylace cílového proteinu je klíčovým faktorem pro vazbu 14-3-3. Tento motiv byl dále upřesněn do dvou podtypů: RSXpSXP (vzor I) a RXY/FXpSXP (vzor II)⁵⁹, kde pS je fosfoserin. Dodnes bylo objeveno také šest proteinů, které obsahují další typ vazebného motivu na C konci: -pS/pT X₁₋₂-COOH (vzor III) (kde X není Pro)⁶⁰. Současně byly demonstrovány nové role C koncového motivu vzoru III při přepisování lokalizačního signálu Arg-Lys-Arg endoplasmatického retikula a při navádění membránových proteinů na povrch buňky^{61,62}.

Yaffe a kol.⁵⁹ a Rittinger a kol.⁶³ provedli strukturní charakterizaci interakcí strukturních motivů I a II s proteiny 14-3-3. Ukázalo se, že zbytky 14-3-3 důležité pro vazbu fosfopeptidu jsou plně konzervované u všech 14-3-3 isoform. Vazebné místo fosfoserinu se skládá z kladně nabitě části obsahující aminokyselinové zbytky Lys50, Arg57 a Arg128 stejně jako Tyr129 z třetího a pátého helixu.

Zatím známe poměrně málo dostupných krystalových struktur komplexů 14-3-3 s interagujícím proteinem. Patří mezi ně např. krystalová struktura komplexu 14-3-3 s AANAT (arylalkylamin N-acetyltransferasa). AANAT řídí denní rytmus syntézy melatoninu. Při izolaci z tkáně se AANAT kopurifikuje s isoformami ε a ζ proteinů 14-3-3 a také bylo zjištěno, že vazba AANAT se 14-3-3ζ je závislá na fosforylaci AANAT. AANAT se váže do centrálního kanálu 14-3-3ζ dimeru a je udržována na místě extenzivními interakcemi jak s amfipatickým fosfopeptidovým vazebným žlábkem 14-3-3ζ, tak i s ostatními částmi centrálního kanálu. Vazba AANAT se 14-3-3ζ moduluje aktivitu AANAT a afinitu k jejím substrátům stabilizací oblasti zapojené ve vazbě substrátů. Tuto modulaci ukazují termodynamická měření a měření aktivity společně s krystalografickou analýzou⁶⁴.

Úplná konzervace sekvence v pozorovaných vazebných oblastech 14-3-3 naznačila, že u interakce mezi 14-3-3 a proteinovými ligandy může být malá isoformní specifita. Posttranslační modifikace ale mohou ovlivnit vnější povrch 14-3-3 nebo povrch dimeru. K tomu přispívá fakt, že fosforylovaný 14-3-3 negativně reguluje interakci s N koncovou oblastí Raf kinasy⁶⁵. Vazebné interakce jednotlivých isoform 14-3-3 tak mohou být ovlivněny změnou vlastností povrchu 14-3-3.

Ukázalo se také, že zatímco mnoho proteinů interagujících se 14-3-3 obsahuje RSXpSXP (vzor I) a RXY/FXpSXP (vzor II) vazebné motivy, mnoho vazebných partnerů je neobsahuje, což signalizuje, že přídatné sekvence a vzory interakce (kontaktů) také dovolují vazbu 14-3-3. Existuje 25 ze 133 dobře charakterizovaných fyziologických 14-3-3 vazebných míst na širokém spektru 98 proteinů (hodně jich obsahuje víc než jedno místo), které nemají arginin na pozici 3 nebo 4 vůči fosfoserinovému zbytku. Čtyři vazebná místa nejsou fosforylována a patnáct vazebných míst má arginin na 2. pozici. Mnoho dobře popsanych míst tedy jasně nesouhlasí s konsensy vzorů I a II. To nezhodnocuje konsensus 14-3-3 vazebného motivu jako fyziologickou entitu, ale pravděpodobně odráží fakt, že se u různých proteinů mohly 14-3-3 vazby vyvíjet odlišně. Možná by se pozornost měla věnovat spíš tomu, že vazebná kinetika vlastních fyziologických motivů není optimální. Kdyby byla optimální (např. s nanomolární afinitou), tak by asociace mohla být příliš silná pro regulační roli. Aktuální afinita tedy odráží relativní koncentrace vazebných partnerů v dotyčné subcelulární oblasti a také aktivitu jednotlivých proteinkinas a fosfatas zodpovědných za fosforylaci a defosforylaci.

Řada motivů obsahuje místo fosfoserinu fosfothreonin (threonin se vyskytuje dvanáctkrát v dobře charakterizovaných fosforylovaných motivech). Fosfothreonin se vyskytuje i u jednoho z motivů AANAT a zjistilo se, že není žádný strukturní důvod, proč by se tento zbytek nemohl stejně dobře hodit do vazebného místa jako fosfoserin.

U některých interakcí se zdá, že dimerní charakter proteinu 14-3-3 je esenciální pro jeho plnou funkčnost⁶⁶. Vazba jednoho proteinu do obou vazebných míst dimeru 14-3-3 s menší afinitou může velmi zvýšit specifitu rozpoznávání a afinitu interakce. Vazba peptidů obsahujících dva vazebné motivy je díky kooperativitě mnohonásobně silnější^{59,67}. 14-3-3 proteiny dokáží vázat i nefosforylované motivy. Krystalové struktury takových komplexů ukázaly, že se váží do stejného místa jako fosforylované peptidy⁶⁸.

Existuje mnoho studií ukazujících, že fosforylace motivu může být významnou součástí regulace interakce. Na druhou stranu bylo prokázáno, že i defosforylace může vést k vytvoření nového interakčního motivu. Např. oba seriny 376 a 378 p53 tumor-supresorového proteinu jsou fosforylovány. Waterman a kol.⁶⁹ ukázali, že ionizující radiace vedla k defosforylaci Ser376 a tím vznikl vazebný motiv pro proteiny 14-3-3. Tato interakce pak zvýšila sekvenčně-specifickou vazbu p53 na DNA.

Mezi kinasy, které fosforylují zbytky v motivech pro vazbu 14-3-3 patří AKT kinasa (PKB), PKA, PAK (p21 aktivovaná proteinkinasa 1), RSK1 (Ras-mitogenem aktivovaná proteinkinasa, také známá jako MAPKAP-K1), MAP kinasou aktivovaná proteinkinasa 2 (MAPKAP-K2) a PKC⁵³.

2.2.5. Fosforylace 14-3-3 isoformem

Fosforylace 14-3-3 isoformem na specifických zbytcích má důležitou regulační úlohu, v některých případech předchází interakci. Mezi další interakce patří regulace velkých signálních komplexů. Tento nový vzor regulace interakce na určitém místě je omezen na konkrétní isoformy, které obsahují ve své sekvenci příslušná fosforylační místa (serin či threonin).

Známe data ukazující, že určité isoformy PKC, PKA, JNK, AKT, CKI α a Bcr kinasy fosforylují specifické 14-3-3 isoformy. Všechny tyto Ser/Thr kinasy jsou zapojeny v buněčné signalizaci a regulaci. Tento nový mechanismus modulace interakce 14-3-3 isoformem a jejich cílových proteinů jasně prokazuje funkci proteinů 14-3-3 v buněčné regulaci ve vztahu k rakovině^{70,71}. Také úlohy PKC v buněčné signalizaci a karcinogenezi⁷² jsou dobře prostudovány.

Když mozková PKC, ale ne PKA, fosforylovala některé 14-3-3 isoformy purifikované z mozku na Ser64, nemělo to žádný významný fyziologický dopad²⁹, přestože v této oblasti jsou k tomu výborné předpoklady (toto místo se nachází na rozhraní monomerů). Naopak u mutantů s delecí (26 aminokyselin na N konci), u nichž bylo toto místo exponováno⁷³, se vyskytovaly ve velké míře fosforylované monomery 14-3-3. Také se ukázalo, že velké syntetické peptidy nesoucí tuto sekvenci jsou rovněž stechiometricky fosforylovány na Ser64⁷³. Dimery 14-3-3 jsou za normálních podmínek velmi stabilní⁷⁴. Woodcock a kol.^{75,76} ukázali, že 14-3-3 ζ může být fosforylován pomocí kinasy PKA, když je aktivován pomocí sfingosinu (ne způsobem závislým na cAMP). Tímto mechanismem PKA specificky fosforylovala Ser59 a tím konvertovala dimer na monomer. Mohlo by se jednat o nový mechanismus regulace interakcí proteinů 14-3-3.

Signalizace přes fosfatidylinositol 3 kinasu (PI3K)/proteinkinasu B (PKB) hraje důležitou roli v biologii lidské rakoviny⁷⁷. Na rekombinantní 14-3-3 ζ je účinně fosforylován zbytek Ser58 pomocí PKB, což naznačuje možnou roli 14-3-3 ζ

v procesech souvisejících s PI3K/PKB signální dráhou⁷⁸. U této isoformy však fosforylace neměla vliv na stabilitu dimeru.

Skupinu mitogenně aktivovaných proteinkinás (MAPKs) představuje c-Jun N-koncová kinasa (JNK). K aktivaci těchto kinás dochází, když jsou buňky vystaveny environmentálním stresům (např. odpovědí na poškození DNA nebo buněčný stres). Aktivovaná JNK zahájí translokaci proteinu Bax na mitochondrie fosforylací 14-3-3 σ a ζ na místech ekvivalentních k Ser185, což vede k disociaci Bax z komplexu se 14-3-3⁷⁹. Mutanti 14-3-3, kterým chybí toto fosforylační místo, blokuji přemístění proteinu Bax na mitochondrie, vypuštění cytochromu *c* a apoptózu. Fosforylace proteinu 14-3-3 pomocí kinasy JNK také disociuje proapoptotické proteiny BAD a člena rodiny *Forkhead* transkripčních faktorů – FOXO3a ze 14-3-3, což zvrátí efekty Akt signalizace⁸⁰. Po této disociaci je BAD defosforylován a přesunut na mitochondrie, kde se asociuje s proteinem Bcl-2/Bcl-xL. Fosforylace 14-3-3 prostřednictvím kinasy JNK působí na lokalizaci c-Abl a společně s další regulací těchto proapoptotických proteinů zvyšuje přístupnost k apoptotickým signálům⁸¹. V mozku savců se ve velké míře vyskytují 14-3-3 β a ζ fosforylované na Ser185⁸². Isoformy 14-3-3 ϵ a σ obsahují serinový zbytek na ekvivalentní pozici k Ser185 a jsou na tomto místě také fosforylovány kinasou JNK. Isoforma ϵ není endogenně fosforylována.

Fosforylace 14-3-3 ζ *in vivo* na zbytku Thr233 negativně reguluje vazbu na kinasu c-Raf, což může být důležité v přenosu signálu⁶⁵ regulovaném Raf. Pro aktivaci Raf-1 a stejně Raf kinasy je nutná aktivita fosfatasy PP2A, která defosforyluje kritická regulační vazebná místa 14-3-3 pro protein KSR1 a zahajuje aktivaci tzv. MAPK signální dráhy.

Onkogenní produkt – protein Bcr (breakpoint cluster region) se jeví jako Bcr-Abl chiméra a vyskytuje se při myelogenní leukémii (CML)⁸³. Bcr má aktivitu proteinkinasy, jež může fosforylovat serinové, threoninové a tyrosinové zbytky. Kromě CML je Bcr kinasa prvkem celé řady signálních drah. Bcr kinasa fosforyluje isoformy 14-3-3 τ a ζ *in vitro* a *in vivo* na Ser a Thr zbytcích na C konci^{34,84}. Zároveň Bcr interaguje nejméně s pěti různými 14-3-3 isoformami *in vivo*.

Obšilová a kol.⁸⁵ publikovali, že fosforylace 14-3-3 ζ na Thr233 vedla k inhibici vazby fosfopeptidů. Podle fluorescenčních měření fosforylace Thr233 indukuje konformační změnu C koncové části isoformy 14-3-3 ζ , což pravděpodobně ovlivňuje interakce této oblasti se zbytkem molekuly 14-3-3.

Proteiny 14-3-3 váží p110 podjednotku kinasy PI3K⁸⁶ a negativně regulují její aktivitu. Inhibitor tyrosinové fosfatasy pervanadičnan posiloval vazbu 14-3-3 τ s PI3K, což by mohlo znamenat, že proteiny 14-3-3 také mohou vázat fosfotyrosinové motivy.

Stojí za zmínku, že fosforylace na žádném uvedeném místě nevede ke změně pohybu, posunu proužku či zpomalení na SDS-PAGE. Protein 14-3-3 je sám o sobě kyselý protein s pI okolo 4,5 - 4,6 a fosforylace má relativně malý efekt na vazbu SDS ve srovnání s ostatními proteiny. Tento rys tedy nemůže být „diagnosticky“ využit.

2.3. Interakce ASK1 kinasy s proteiny 14-3-3

Aktivita ASK1 je řízena různorodými mechanismy, jako jsou kovalentní modifikace a protein-proteinové interakce. Jednou takovou interakcí je vazba s proteinem 14-3-3 ζ . Subramanian a kol.¹ dokázali, že ASK1 kinasa se váže i s jinými isoformami 14-3-3. V závislosti na cílovém proteinu mohou proteiny 14-3-3 inhibovat nebo aktivovat katalytickou aktivitu asociovaných enzymů, měnit jejich interakci s ostatními proteiny nebo vyvolávat relokizaci jejich vazebných partnerů^{87,88}.

Analýza ukázala, že interakce mezi ASK1 kinasou a proteinem 14-3-3 je ovlivňována konzervovaným amfipatickým žlábkem ve struktuře proteinu 14-3-3. V důsledku exprese isoformy 14-3-3 je potlačena apoptosa vyvolaná ASK1 kinasou. Koexprese 14-3-3 souvisí také s translokací ASK1 kinasy z cytoplazmy do perinukleárního prostoru (např. na ER). To potvrdil i fakt, že při koexpresi s 14-3-3 ζ ASK1 kinasa S967A (mutant, který neváže 14-3-3) nevykazovala žádné změny v intracelulární distribuci. Z toho vyplývá, že protein 14-3-3 ζ reguluje proapoptotickou funkci ASK1 kinasy řízením její vnitrobuněčné distribuce. Dále bylo spekulováno, že vazba proteinu 14-3-3 inhibuje enzymovou aktivitu kinasy ASK1⁹².

Embryonické fibroblasty myši, neexprimující ASK1 kinasu, měly po vystavení TNF nebo peroxidu vodíku rovněž výrazně potlačenou schopnost apoptosy. To koreluje s výrazným poklesem dosahované aktivace JNK a p38 MAP kinas⁸⁹. Mnoho proteinů ovlivňuje funkci ASK1 kinasy přímým navázáním na ASK1 kinasu. Proteiny 14-3-3 se váží s ASK1 kinasou pomocí Ser967, který je součástí konsensu vazebného motivu pro proteiny 14-3-3 (RSIS967LP). Pro aktivaci ASK1 kinasy je zapotřebí fosforylat Thr845. Naopak fosforylace Ser83 a Ser967 inhibují její proapoptotickou funkci^{14,90,91}.

2.4. ASK1 kinasa a regulace oxidativním stresem

Oxidativní stres hraje roli u řady patologických procesů jako jsou aterosklerosa, diabetes a neurodegenerativní onemocnění. Reakce buněčných signálních drah na oxidativní ohrožení, jako je peroxid vodíku, by mohly být terapeuticky významné. Genetické studie potvrdily, že ASK1 kinasa hraje klíčovou úlohu v předávání signálů iniciovaných peroxidem vodíku. Princip jakým je ASK1 kinasa aktivována peroxidem vodíku, je přesto stále předmětem intenzivního výzkumu⁹².

Reaktivní sloučeniny kyslíku (reactive oxygen species, ROS) jsou tvořeny v řadě buněčných procesů či přijímány z exogenních zdrojů. Hrají důležitou roli v udržování normální fyziologie. Mezi jimi ovlivněné děje patří buněčná proliferace, přežití, senescence a apoptotická buněčná smrt. Nekontrolovaná a nadměrná tvorba ROS může vést k vážnému poškození buněčných komponent (DNA, proteiny a lipidy). ASK1 kinasa nebo její funkční fragment, ASK1-KC, může spustit mitochondriální proces vedoucí k apoptose (signální dráha kaspasy 3). Navíc exprese katalyticky neaktivní ASK1 kinasy vykazuje dominantně negativní efekt a inhibuje apoptosu vyvolanou stresovými signály jako jsou tumor necrosis faktor nebo peroxid vodíku. Z toho vědci došli k závěru, že ASK1 kinasa hraje klíčovou roli v mediaci signálů oxidativního stresu. ASK1 kinasa je pevně řízena několika mechanismy, fosforylací, oligomerizací a protein-proteinovými interakcemi. Podmínkou aktivity ASK1 kinasy je její fosforylace na Ser845, protože defosforylace na tomto místě pomocí PP5 vede k deaktivaci ASK1 kinasy. Na druhou stranu fosforylace na Ser83 pomocí Akt/proteinkinasy B zvýší aktivitu ASK1 kinasy. Důležité jsou také intramolekulární interakce, pravděpodobně mezi N a C koncovými doménami ASK1 kinasy. Tyto interakce umožňují získat ASK1 kinasu v neaktivním stavu. Naopak oligomerizace C koncové domény vede k aktivaci ASK1 kinasy. Mnoho proteinů váže ASK1 kinasu v rámci regulační dráhy. Například vazba TRAF2 nebo Daxx ovlivňuje ASK1 kinasu tak, že kinasové a proapoptotické aktivity ASK1 kinasy jsou inhibovány jinými asociovanými proteiny, včetně thioredoxinu, Cdc25A, Hsp 72, proteinu 1 interagujícího s ASK1 a proteinu 14-3-3. Za normálních podmínek je pravděpodobně, že je u ASK1 kinasy potlačována její schopnost vyvolat apoptosu a to specifickou fosforylací a protein-proteinovými interakcemi. Existuje mechanismus reakce na H₂O₂, který ovlivňuje redoxně regulovanou disociaci ASK1 kinasy z vazby s thioredoxinem, což vede k oligomerizaci

kinasy ASK1 a její aktivaci. Samotná inhibiční schopnost vazby thioredoxinu na ASK1 kinasu, ale může být nezávislá na redoxním stavu⁹².

Stresové signály mohou využít citlivou kinasovou a fosfatasovou síť a řídit tak funkci ASK1 kinasy. Dojde tak k odpovídajícímu biologickému výsledku, buď k buněčné sebevraždě nebo k přežití buňky. Bylo nalezeno klíčové spojení mezi signalizací přítomnosti peroxidu vodíku a fosforylací Ser967. Fosforylace Ser967 řídí vazbu proteinu 14-3-3 a ASK1 kinasy. Je to nový mechanismus, kde H₂O₂ spouští aktivitu fosfatasy citlivé na okadaickou kyselinu. Tato fosfatasa se v regulační dráze nachází před ASK1 kinasou. Aktivace této fosfatasy vede k defosforylaci Ser967 a předjímá aktivaci stresových drah ovlivněných ASK1 kinasou.

2.5. Regulační dráhy MAP kinas

Vnitrobuněčný redoxní stav je klíčový ukazatel buněčného osudu. V závislosti na něm dochází k buněčnému přežití, proliferaci, diferenciaci a apoptose. Redoxní stav buňky je důsledkem rovnováhy mezi množstvím oxidačních a redukčních ekvivalentů, jako jsou ROS a endogenní oxidanty. ROSy nepatří jen mezi škodliviny, ale také jsou to druhotné přenašeče signálu. Řídí akce několika signálních drah. Jednou z těchto drah je dráha mitogenně aktivovaných proteinových (MAP) kinas. Kinasa ASK1 patří k drahám c-Jun N-koncové kinasy (JNK) a p38 MAP kinas. Je také označována jako MAP kinasa kinasy kinasy. ASK1 kinasa je aktivována různým druhem stresu, především pak oxidativním⁹³.

Ve vnějším i vnitřním prostředí jsou buňky vystaveny stresu. Mezi tyto stresové podněty patří oxidativní stres, γ -záření, UV záření, stres endoplazmatického retikula a infekce. Pro aerobní organismy je vystavení reaktivním formám kyslíku (ROS) stále a nevyhnutelné. Nadměrná produkce ROS způsobuje molekulární poškození a časem vede k buněčné a tkáňové dysfunkci, tím se zvyšuje riziko nemocí a zrychluje se tak stárnutí.

Kaskáda mitogenně aktivovaných proteinových (MAP) kinas je evolučně velmi konzervovaná u všech eukaryotických buněk a zahrnuje tři hlavní moduly, MAP kinasy kinasy kinasy (MAP3K), MAP kinasy kinasy (MAP2K) a MAP kinasy (MAPK)^{94,95}. Hlavní zástupci rodiny MAP kinas jsou c-Jun N-koncová kinasa (JNK), p38 MAPK a kinasa regulující extracelulární signály (ERK). Tyto molekuly jsou zásadní pro odpověď na změny životního prostředí.

MAP3K, největší signální moduly, rozpoznají stupeň poškození v počáteční (upstream) fázi vnitrobuněčné signální dráhy, regulují kaskádu MAPK a určují tak buněčný osud. Kinasa ASK1 je redoxním ukazatelem MAP3K v signalizaci apoptózy vyvolané oxidativním stresem. Koncové (downstream) MAP kinasy mohou fosforylovat různé substráty. Mezi tyto substráty patří efekторы a výkonné jednotky buněčné odpovědi na stres⁹⁶.

Dráha ERK je běžně spojována s regulací buněčné proliferace. Dráhy JNK a p38 jsou aktivovány stresem z okolního prostředí, jako je osmotický šok, UV záření, tepelný šok, oxidativní stres a inhibitory syntézy proteinů⁹⁷. Aktivace těchto drah vede k ovlivnění přežití buňky. O výsledku rozhoduje jak rozsah, tak trvání aktivace MAPK⁹⁸. Přítomnost ROS tak vede k velkému množství biologických odpovědí. Specifické inhibitory nebo exprese dominantně negativních mutantů JNK a p38 drah potlačují apoptosu vyvolanou stresem^{97,99}. Ukázalo se, že pokud ROS způsobí aktivaci dráhy p38, může dojít k negativnímu ovlivnění tumorigeneze. V rakoviných buňkách se zahájí apoptosa¹⁰⁰. Některá data nabízejí mechanismy možné souvislosti ROS a SAPK (proteinkinasy aktivované stresem). Antioxidanty a nepřiměřená exprese antioxidantních enzymů, jako jsou glutathion S-transferasaPi (GSTp), mohou blokovat nebo oddálit apoptózu. GSTp může reagovat s JNK a potlačit tak její aktivaci. Na druhou stranu ROS opět uvolní JNK z komplexu s GSTp a tím obnoví aktivaci JNK¹⁰¹. Mechanismus jakým dráhy SAPK regulují apoptosu vyvolanou oxidativním stresem není zcela objasněn¹⁰². Serin/threonin a tyrosin fosfatasy mohou být regulovány změnou oxidačního stavu funkčních skupin aktivního místa. Například pokud je fosfatasa, která je zodpovědná za defosforylaci JNK, inhibována, vede to k stálé aktivaci JNK¹⁰³.

2.6. Regulace apoptosy vyvolané oxidativním stresem

V rodině proteinů ASK kinas je kinasová doména vysoce konzervovaná. Odlišnosti se vyskytují v primární struktuře N a C konce⁹³. ASK1 kinasa obsahuje na svém N konci motiv pro FKBP-typ peptidyl-prolyl cis-trans isomerasy a na C konci vazebný motiv pro proteiny 14-3-3. Prokázalo se, že fosforylačně specifická peptidyl-prolyl isomerace hraje významnou roli v různých biologických procesech a patologických projevech jako jsou rakovina, neurodegenerace a stárnutí^{104,105}, ale u ASK1 kinasy zůstává funkce tohoto motivu neznámá. Aktivace proteinů ASK je řízena fosforylací threoninových zbytků v aktivačním místě kinasové domény. Zvýšená

hladina ROS přesahující antioxidační pufrační kapacitu buňky může vést k cytotoxickému oxidačnímu stresu a k apoptose. ROS, jako je peroxid vodíku, je nejčastějším aktivátorem ASK1 kinasy. Jako negativní regulátor ASK1 kinasy byl identifikován protein thioredoxin¹⁶. Buňky v klidovém stavu obsahují komplex Trx a ASK1 kinasy a po vystavení TNF nebo ROS se ASK1 kinasa disociuje z Trx a dochází k její plné aktivaci. Trx má ve svém aktivním centru dva redoxně citlivé cysteinové zbytky, proto se jedná o redoxně regulační protein. Pouze redukováná forma Trx se může asociovat s N koncovou regulační doménou ASK1 kinasy. Tím brání Trx aktivaci ASK1 kinasy. Komplex Trx s ASK1 kinasou tedy představuje redoxní sensor, který převádí redoxní stav buňky na kinasovou signalizaci.

Dalším negativním regulátorem ASK1 kinasy je proteinová serin/threoninová fosfatasa 5 (PP5)¹⁰⁶. Fosfatasa PP5 se při oxidačním stresu váže a defosforilyje aktivovanou formu ASK1 kinasy. Tím umožňuje její inaktivaci negativní zpětnou vazbou. Redoxně řízené proteiny jako jsou Trx a PP5 mohou blokovat apoptosu vyvolanou oxidačním stresem. Rovněž potvrzují, že ASK1 kinasa hraje zásadní roli v signální transdukcii a apoptose vyvolané oxidačním stresem.

ASK1 kinasa tvoří přes C koncovou helikální doménu (CCC) komplex o velké molekulové hmotnosti (1500 kDa) a tvorba tohoto komplexu je podstatná pro její aktivaci¹⁰⁷. Mutant ASK1 kinasy, postrádající CCC doménu, tvořil menší komplex (500 kDa), jenž neměl žádnou měřitelnou aktivitu. Také endogenní ASK1 kinasa tvoří velký komplex podobný tomu vytvořenému exogenně exprimovanou ASK1 kinasou. Tento komplex byl nazván ASK1 signalosom^{107,108}, protože je tvořen důležitými regulačními proteiny (Trx) a zdá se být základem pro řízení aktivace ASK1 kinasy.

Trx inhibuje aktivitu ASK1 kinasy přímou vazbou na její N konec. N koncová helikální doména (NCC) je důležitá pro řízení aktivace ASK1 kinasy pomocí Trx¹⁰⁹. Trx zabraňuje oligomerizaci ASK1 kinasy přes NCC. Po vystavení buněk ROS a disociaci Trx a ASK1 kinasy se ASK1 kinasa oligomerizuje přes NCC i přes CCC doménu a tím dochází k její plné aktivaci. Přestože Trx se disociuje z ASK1 kinasy, tak ASK1 signalosom má stále vyšší molekulovou hmotnost (3000 kDa) než ASK1 kinasa v klidovém stavu¹⁰⁷.

Toto pozorování ukazuje, že v signalosomu jsou obsaženy i další faktory. Jde o faktory asociované s receptorem TNF, TRAF2 a TRAF6. Jsou to adaptérové proteiny vázající se na receptory na povrchu buňky. Tyto faktory byly identifikovány jako části ASK1 signalosomu při stresu ROS. Proteiny TRAF2 a TRAF6 jsou proteiny interagující s ASK1 kinasou a významně řídí její aktivitu. Například vazba TRAF2 nebo Daxx ovlivňuje funkce ASK1 kinasy tak, že kinasové a proapoptotické aktivity ASK1 jsou inhibovány jinými asociovanými proteiny. Jsou to pozitivní regulátory a jsou závislé na řadě podnětů jako je TNF, ER stres a LPS^{12,110,111}.

3. Metody

3.1 Materiál

3.1.1. Chemikálie

Akrylamid – Carl Roth GmbH, Německo

Ampicilin – Sigma, USA

Bacto krypton (pepton) – Carl Roth GmbH, Německo

Bacto yeast extract (kvasničný extrakt) – Carl Roth GmbH, Německo

Bis-akrylamid – Carl Roth GmbH, Německo

Bromfenolová modř – Sigma, USA

BSA – Sigma, USA

Coomassie Brilliant, Blue R-250 – Lachema a.s., ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný – Lachema a.s., ČR

DTT (dithiotreitol) – Carl Roth GmbH, Německo

EDTA – Sigma, USA

Glycin – Carl Roth GmbH, Německo

Glycerol – Lachema a.s., ČR

Hydrogenfosforečnan draselný – Lachema a.s., ČR

Chlorid sodný – Carl Roth GmbH, Německo

IPTG – Sigma, USA

Isopropylalkohol – Sigma, USA

Kyselina chlorovodíková – Lachema a.s., ČR

Kyselina octová – Lachema a.s., ČR

Methanol – Lachema a.s., ČR

Močovina – Sigma, Německo

Persulfát amonný – Sigma, USA

SDS – Sigma, USA

Síran nikelnatý – Penta, ČR

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) – Carl Roth GmbH, Německo

Thrombin – Sigma, USA

Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) – Carl Roth GmbH, Německo

Lysozym – New England BioLabs, USA

Standard molekulových vah – Precision Plus Protein Dual Color Standard – BioRad, USA

3.1.2. Přístrojové vybavení

Centrifuga – Eppendorf 5415D, rotor F45-24-11

Centrifuga – Eppendorf 5804R, rotor A-4-44

Centrifuga – Biofuge 28RS, rotor 3746

Centrifuga – Refrigerated centrifuge K80, Německo, rotor S-6/6,6

Chromatografie – HPLC-AKTA, Amersham Biosciences, USA

Inkubátor – P-lab, ČR

Laboratorní váhy – HF-200g, AND, USA

Magnetická míchačka MM 2A – Laboratorní přístroje Praha, ČR

Peristaltická pumpa – Ecoline, Ismatec

pH metr – JenWay 3505, Felsted Velká Británie

Přístroj na elektroforézu – BioRad, Itálie

Přístroj na výrobu ledu – F125 Compact Icematic

Sonikátor - Misonix incorporated, USA

Termostat BT 120M – laboratorní přístroje Praha, ČR

Třepačka – Introus HP multitron, Německo

UV-Vis absorpční spektrofotometr – Agilent 8453

Vodní lázeň – Memmert, Velká Británie

Vortex – Zx3, Velp Scientifica, Itálie

Zdroj pro elektroforézu – Consort E143, Belgie

3.1.3. Ostatní materiál

Dialyzační membrána – MCO (Molecular weight cut off) 14000 – Roth, Německo

Filtry 0,45 µm – Whatmann Internation Ltd, Velká Británie

Injekční stříkačky pro nános a filtraci roztoků proteinu – Chirana T. injecta a.s., SR

Laboratorní sklo – Simax, ČR

Mikrozkmavky – Oxygen Scientific Inc., USA

Náplně do kolon a kolony – Amersham Biosciences, USA

Pipeta 25 µl – Hamilton Co, USA

Pipety – Eppendorf, Německo

Rukavice – Beromed GmbH Hospital Products, Německo

Špičky pro pipety – INSET, Praha ČR

3.2. *Expresse kinasy ASK1*

Pro tuto práci byl použit protein lidská ASK1, konstrukt B. Tato část obsahuje aminokyselinové zbytky 659 – 973. Katalytická doména je v místě 670 – 940 a 14-3-3 vazebné místo zahrnuje zbytky 964 – 969. Koncové části přesahují tato místa, aby byla zachována jejich přirozená struktura.

3.2.1 Transformace

Transformace je metoda přípravy rekombinantních bakterií. Využívá propustnosti bakteriální membrány při rychlé změně teploty „Heat shock“. Pro transformaci byl použit kmen bakterií *Escherichia coli* BL21(DE3) schopný exprimovat protein vnesený do komerčně dostupného expresního vektoru pET15b. Směs 5 µl DNA ASK1 B v expresním vektoru pET15b o koncentraci 0,15 µg/µl a 40 µl bakterií *Escherichia coli* BL21(DE3) byla nechána 20 min při 4 °C a poté 1 min ve vodní lázni při 42 °C. Byl přidán 1 ml media LB a buňky byly inkubovány 45 min při 37 °C, dále odstředěny při 4600 rpm po dobu 1 min. Byl slit supernatant, pelety resuspendovány a ve sterilním prostředí naneseny v množství 50 - 100 µl na misku s agarem a ampicilinem (100 µg/ml) a inkubovány při 37 °C po dobu 14 hod.

3.2.2. Kultivace bakterií

Kolonie bakterie *E. coli* BL21(DE3) s genem pro ASK1 B kinasu byly ve sterilním prostředí naočkovány do zkumavek s kapalným LB médiem a s ampicilinem v koncentraci 100 µg/ml. Tyto zkumavky s bakteriální kulturou byly inkubovány za konstatního míchání (220 rpm, 14 hod, 37 °C).

Bakteriální kultura byla naočkována do Erlenmayerových baněk s kapalným LB médiem a ampicilinem ve finální koncentraci 100 µg/ml a byly umístěny do třepačky

(220 rpm, 37 °C). V 30 minutových intervalech byla měřena optická densita nárůstu buněk při vlnové délce 600 nm proti slepému vzorku (čisté LB medium). Po dosažení požadované optické density byl přidán roztok IPTG, který iniciuje expresi, do finální koncentrace 1 mM. Erlenmayerovy baňky byly umístěny do třepačky, teplota byla udržována na požadované hodnotě (25 respektive 37 °C) a bakterie byly inkubovány 14 hod v třepačce (220 rpm).

Obsah Erlenmayerových baněk byl přemístěn do kyvet a odstředěn ve velkokapacitní centrifuze (4°C, 30 min, 3400 rpm), supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v pufru na resuspendaci.

Příprava LB média: 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH upraveno na 7,4 a následně sterilizováno v autoklávu

Příprava TB média: 800 ml destilované vody, 12 g tryptonu, 24 g kvasničného extraktu, 4 ml glycerolu doplněno destilovanou vodou do 900 ml a sterilizováno v autoklávu, doplněno do 1 l 100 ml filtrovaného sterilizovaného roztoku 0,17 M $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,72 M $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Pufr na resuspendaci: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 1 - 2 mM PMSF, 2 mM EDTA

3.2.3. Sonikace

Sonikace je metoda využívající ultrazvuk k mechanickému rozrušení buněk. Suspenze buněk byla inkubována na míchadle s lysozymem ve finální koncentraci 0,1 mg/ml při 4 °C 1 hodinu. Lysozym je enzym štěpící buněčnou stěnu bakterií. Poté byla suspenze přelita do plastové nebo pyrexové kádinky a na ledové lázni sonikována. Podmínky sonikace byly 20 s puls následovaný 30 s pauzou na schlazení suspenze. Byl použit výkon 57 W a čistý čas sonikace byl 10 minut (30 cyklů). Sonikát byl přelit do 50 ml plastových zkumavek a centrifugován (4 °C, 20 min, 5000 rpm), supernatant byl přelit do centrifugačních kyvet a centrifugován (4 °C, 30 min, 13500 rpm).

3.2.4. Test rozpustnosti

Testem rozpustnosti se dá zjistit do jaké části buňky se protein exprimuje. Pro purifikaci proteinu v nativní formě je důležité, aby byl konstrukt rozpustný ve vodě, tzn. obsažený v cytosolu. Biomasa po indukci exprese proteinu a inkubaci 14 hod při 25 - 37 °C byla odstředěna (4 °C, 30 min, 3400 rpm) a resuspendována v 750 µl pufru. Pro narušení membrány byl přidán lysozym v koncentraci 100 µg/ml, pelety byly inkubovány na míchaladle 20 min při 4°C a sonikovány s parametry 20 s puls a 20 s pauza při výkonu 57 W po dobu 5 cyklů. Poté byla suspenze odstředěna při 4 °C, 10 min, 20000 rcf pro oddělení nesonikovaných bakterií. Supernatant byl odebrán. Peleta, kde mohl zůstat protein v inkluzích, byla rozmělněna s 200 µl pufru s močovinou, 15 min vortexována a odstředěna (4 °C, 10 min, 5000 rpm).

3.3. Purifikace proteinů

3.3.1. Niklová chelatační chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při níž jsou separované látky rozpuštěny v mobilní fázi (kapalina, plyn) a procházejí kolonou naplněnou stacionární fází. U chelatační chromatografie je stacionární fází pórovitá pevná matrice s navázanými chelatujícími ionty těžkých kovů. Tato metoda využívá schopnosti proteinů nekovalentně vázat specifické molekuly. Tyto molekuly, zvané ligandy, jsou ukotveny v inertní matrici. Konstrukty separovaných proteinů obsahují motiv šesti po sobě jdoucích histidinových zbytků (His-tag). Chromatografie s chelatujícími nikelnatými ionty využívá schopnosti nikelnatých kationtů chelatovat His-tag afinitní kotvu a tím umožnit dočasnou vazbu proteinu na matrici. Matrice chelatující Sepharosa byla nabita nikelnatými ionty, byl na ni nanesen vzorek při pomalém průtoku 1 – 2 ml/min a následně eluován pufrům s vysokou koncentrací imidazolu (250 – 600 mM). Imidazol má větší afinitu k nikelnatým iontům než histidin a způsobí tak uvolnění proteinu z matrice.

Kolona obsahovala chelatující Sepharosu (Amersham Biosciences, Švédsko) a byla postupně promyta:

10 ml H₂O

10 ml Stripp solution (50 mM EDTA, 0,5 M NaCl)

15 ml H₂O

50 ml Ni^{2+} (0,1 M NiSO_4)
10 ml H_2O
10 ml ekvilibračního pufru

Poté byl na kolonu nanesen sonikát. Sonikát byl nanášen za použití peristaltické pumpy a malého průtoku 1 - 2 ml/min. Malý průtok je důležitý pro vazbu histidinové kotvy na matici. Nikelnaté ionty se koordinovaly s imidazolovými zbytky His. Po nanesení veškerého sonikátu byla kolona promyta ekvilibračním pufrem v množství 10 CV (objem kolony z angl. Column volume) a promývacím pufrem s nižší koncentrací imidazolu (60 mM) 10 CV. Protein byl eluován elučním pufrem s nejvyšší koncentrací imidazolu (250 – 600 mM). Eluát byl sbírán do mikrozkušavek umístěných v ledové lázni, eluované frakce byly odebírány po 1 ml. Pro vizualizaci obsahu proteinu v jednotlivých frakcích byla provedena SDS elektroforéza na 12% polyakrylamidovém gelu.

3.3.2. Test vazby na matici

Pro zjištění schopnosti konkrétního proteinu vázat se na matici byl proveden test vazby na matici. Na test bylo použito 700 μl proteinu o koncentraci 1,5 mg/ml. 1 ml matrice je schopen vázat optimálně 5 mg proteinu. Příliš mnoho matrice znamená nespecifické vázání nežádoucích proteinů, málo matrice znamená snížení výtěžku. Pro zachování optimálního poměru mezi množstvím proteinu a maticí bylo použito 200 μl matrice. Test se provádí v malém množství vsádkovou metodou, promývání pufru a eluce probíhá pomocí centrifugy (4 °C, 2 min, 1600 rpm). Do ekvilibračního pufru byl přidán merkaptoethanol, který způsobí redukci cysteinových můstků a lépe zpřístupní histidinovou kotvu. Vzorky byly před odstředěním inkubovány 15 min na ledu při 4 °C. Vzorek byl promyt 2 ml promývacího pufru s nízkou koncentrací imidazolu (20 mM). Bylo přidáno 200 μl elučního pufru s vyšší koncentrací imidazolu (150 mM). Supernatant byl odebrán k analýze a eluce opakována. Na poslední frakci byla zvýšena koncentrace imidazolu v elučním pufre na 300 mM.

3.3.3. Dialýza

Dialýza je forma molekulové filtrace, jedná se o separační metodu. Dochází při ní k separaci molekul podle jejich velikosti za použití polopropustné membrány o velikosti pórů menší než jsou rozměry dané makromolekuly. Membrána je nepropustná pro vysokomolekulární látky a propustná pro nízkomolekulární látky. Nízkomolekulární látky se pohybují skrz dialyzační membránu ve směru klesajícího koncentračního gradientu. Může být používána k výměně rozpouštědla daného vzorku.

Dialýza byla použita pro výměnu pufru na niklovou chelatační chromatografii za pufr pro aniontově-výměnnou chromatografii. Vzorek proteinu byl umístěn do dialyzačního střívka, ponořen do dialyzačního pufru a na míchadle inkubován po dobu 14 hod.

3.3.4. Aniontová-výměnná chromatografie

Při iontové-výměnné chromatografii jsou ionty, které jsou elektrostaticky vázány na nerozpustnou a chemicky inertní matici, reverzibilně vyměňovány za ionty rozpouštědla. Iontoměniče mohou být kationtové či aniontové. U polyiontů, které nesou oba náboje, se mohou vázat kationty i anionty. Při aniontové-výměnné chromatografii se využívá aniontového iontoměniče. Afinita polyiontů závisí na identitě a koncentraci ostatních iontů v roztoku. Soutěží s nimi o vazebné místo na iontoměniči. Afinita polyiontů nesoucích acidobazické skupiny je závislá na pH, které ovlivňuje náboj molekuly. Při pH vyšším než je pI proteinu má protein náboj záporný a při pH nižším než je jeho pI má náboj kladný.

Q-Sepharosová kolona (Amersham Biosciences, Švédsko) byla nejdříve promyta vodou a poté puftrem s nízkou iontovou silou (20 mM NaCl) až do ustálení vodivosti. Průtok byl 1 ml/min.

Poté byl nanesen vzorek v objemu 1,5 ml. Kolona byla dále promyta 1 CV ekvilibračním puftrem s nízkou iontovou silou a dále promývána směsí pufrů se zvyšujícím se gradientem iontové síly v rozsahu 4 CV.

Frakce v objemu 0,5 ml byly jímány do mikrozkušavek a vizualizovány pomocí SDS-PAGE. Jelikož během purifikace dochází k ředění roztoku proteinu, tak bylo nutné provést před gelovou permeační chromatografií zkoncentrování vzorku. Vybrané frakce byly zkoncentrovány na minimální možný objem centrifugací v centrikonech (4 °C, 6

+ 9 min, 4000 rpm). Centrikony jsou zkumavky složené ze dvou částí (4 ml a 3 ml) oddělených celulosovou membránou prostupnou pro molekuly určité velikosti.

3.3.5. Gelová permeační chromatografie

Při gelové permeační chromatografii jsou molekuly děleny podle své velikosti a tvaru. Menší molekuly se zachytávají v zrnkách pórovitého gelu, projdou pórem, a proto migrují pomaleji. Velké molekuly se v zrnkách nezachycují a migrují rychleji.

Kolona pro gelovou permeační chromatografii (Superdex 75, 200, 10/300 GL, Amersham Biosciences, Švédsko) byla promyta vodou a poté ekvilibrována pufrem pro gelovou permeační chromatografii až do ustálení vodivosti. Průtok byl 0,5 ml/min. Poté byl nanesen vzorek a frakce byly sbírány po 0,5 ml do mikrozkušavek. Vizualizace byla provedena pomocí SDS-PAGE a vzorky byly uchovávány při -80 °C.

3.4. *Odštěpení histidinové kotvy thrombinem*

Thrombin je proteasa, která rozpoznává sekvenci Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser a štěpí peptidovou vazbu mezi Arg a Gly. Tohoto místa pro štěpení využívají mnohé vektorové systémy k odštěpení „upstream“ domény. Většinou se jedná o purifikační kotvy jako je His-tag.

Pro odštěpení His-tag afinitní kotvy z N konce ASK1 kinasy byla použita koncentrace thrombinu 3 - 5 unit/mg proteinu. Thrombin byl přidán ke vzorku po gelové permeační chromatografii a směs byla inkubována při laboratorní teplotě. Vzorky byly odebírány v různých časových intervalech a vizualizovány pomocí SDS-PAGE.

3.5. *Test stability*

Test stability proteinu ukazuje, jestli a do jaké míry se daný protein rozkládá za daných podmínek. Získané frakce po gelové permeační chromatografii byly testovány při laboratorní teplotě a při teplotě 4 °C. Vzorky byly odebírány v různých časových intervalech a vizualizovány pomocí SDS-PAGE.

3.6. Stanovení koncentrace proteinu - metoda Bradfordové

Metoda Bradfordové využívá vazby barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu. Tato vazba závisí na obsahu bazických a aromatických aminokyselin.

Velké množství látek však s touto vazbou interferuje a výsledky metody ovlivňuje, například detergenty (SDS). Lineární kalibrace spočívá v měření absorbance standardu BSA (hovězí sérový albumin). Byly použity koncentrace albuminu 0,04 mg/ml - 0,3 mg/ml. Ze získané kalibrační přímky byla určena směrnice a její pomocí stanovena koncentrace proteinu. Činidlo hnědé barvy obsahuje barvivo, ethanol a H_3PO_4 , jeho barva se po reakci s proteinem mění na intenzivně modrou. Absorbance se měří při vlnové délce 595 nm v plastových kyvetách.

3.7. SDS-PAGE

Elektroforéza je separační elektromigrační metoda. Ionty migrují v elektrickém poli a přitom dochází k separaci biomolekul. PAGE využívá polyakrylamidový gel. Velké molekuly hůře procházejí gelem a tím se relativně opoždějí.

Při SDS-PAGE je v polyakrylamidovém gelu a pufru pro elektroforézu obsaženo denaturující činidlo dodecylsírán sodný (SDS). SDS má silný záporný náboj, který překryje náboj proteinu, takže proteiny mají identický poměr náboj:hmoty a mají podobný tvar. Dělí se tedy podle své relativní molekulové hmotnosti.

12% separační gel (množství na 2 gely)
3 ml 30% akrylamid/0,8% bisakrylamid
2 ml 1,5 M Tris – HCl (pH 8,8) + 0,4% SDS
2,6 ml H_2O
45 μl 10% (w/v) persulfát amonný (APS)
5 μl TEMED

Zaváděcí gel

0,5 ml 30% akrylamid/0,8% bisakrylamid
1 ml 0,5 M Tris – HCl (pH 6,8) + 0,4% SDS
2,25 ml H_2O

45 μ l 10% (w/v) persulfát amonný (APS)

5 μ l TEMED

Na gel byly do jamek nanесeny vzorky s vzorkovým pufrém a roztok standardu. Tento standard obsahuje 10 rekombinantních proteinů o relativních molekulových hmotnostech 250000, 150000, 100000, 75000, 50000, 37000, 25000, 20000, 15000, 10000. Elektroforéza byla prováděna ve vertikální poloze. Při průchodu vzorku zaváděcím gelem bylo aplikováno napětí 90 V. Později bylo napětí zvýšeno na 150 V po 1 hodinu. Gel byl obarven v barvicím roztoku Commasie Brilliant Blue R 250 30 min a odbarven v odbarvovacím roztoku.

Vzorkový pufr (5x koncentrovaný)

0,5 ml 1M Tris – HCl (pH 6,8)

5 ml 50% glycerol

2 ml 10% SDS

0,5 ml 99% β ME

1 ml 10% bromfenolová modř

0,9 ml voda

Barvicí roztok Commasie Brilliant Blue R 250

1 g Commasie Brilliant Blue R 250

450 ml 99% methanolu

100 ml ledové kyseliny octové (99%)

450 ml H₂O

Odbarvovací roztok

100 ml 99% methanolu

100 ml ledové kyseliny octové (99%)

800 ml H₂O

Pufr na SDS-PAGE

50 mM Tris – HCl (pH 8,3)

385 mM glycín

0,1% SDS

4. Cíl práce

A. Optimalizace expresního protokolu ASK1 kinasy (konstrukt B se sekvencí 659 - 973) s cílem dosažení reprodukovatelné vysoké exprese v bakteriích *E. coli*.

B. Vývoj purifikačního protokolu tohoto konstruktu s cílem přípravy miligramových množství rozpustného a stabilního proteinu.

5. Výsledky

5.1. Expresní konstrukt

Mgr. Petr Vácha mi poskytl konstrukt ASK1 B 659 - 973 zaklonovaný v expresním vektoru pET15b. V přípravné fázi byly po podrobném prostudování problematiky exprese a purifikace ASK1 kinasy navrženy 4 různě dlouhé konstrukty zahrnující katalytickou doménu (úsek 690 – 917 aminokyselinových zbytků) a přilehlé oblasti - ASK1 659 - 969, ASK1 659 - 973, ASK1 668 - 969, ASK1 668 - 973. Tyto konstrukty byly zaklonovány do expresního vektoru pET15b, který poskytuje fúzi s His-tag afinitní kotvou. Expresní test v bakteriích *Escherichia coli* BL21(lambda DE3) prokázal, že je možné připravit protein v dostatečné míře, rozpustný a dostatečně stabilní.

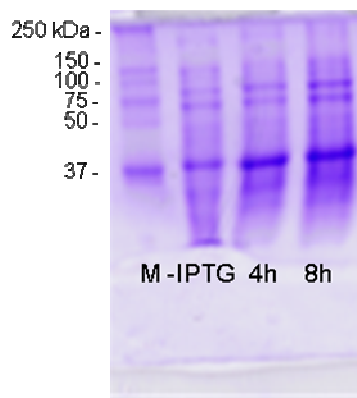
5.2. Exprese I

Podmínky: teplota exprese 37 °C, kultivační medium LB,
indukce byla provedena při optické densitě 0,8 (při vlnové délce 600 nm)

5.2.1. Test exprese

Cílem mé práce bylo najít optimální podmínky pro expresi a purifikaci ASK1 kinasy. Expresní test (viz kapitola Metody) byl proveden pro konstrukt ASK1 B. Buňky byly kultivovány do optické density 0,8, poté indukovány IPTG ve finální koncentraci 1 mM v objemu 10 ml kultivačního media LB a exprimovány při 37 °C. Analýzou gelu bylo zjištěno, že se protein exprimuje. Vzorky na gel byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, vzorek před indukcí, doba exprese 4 h, doba exprese 8 h. Viz

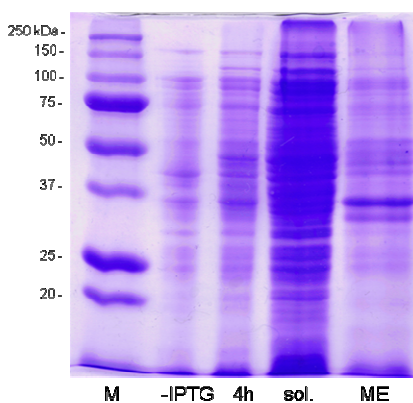
Obrázek 1.



Obrázek 1 – Test exprese. Pořadí vzorků: standard, vzorek před indukcí, exprese 4 h, 8 h

5.2.2. Test rozpustnosti

U získaného proteinu byla testována rozpustnost (viz kapitola Metody). Testem rozpustnosti se dá zjistit v jaké formě se protein exprimuje. Po odstředění byla biomasa resuspendována v pufru o složení 50 mM Tris-HCl (pH 8,8), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA. Peleta nerozpustná ve vodném pufru byla resuspendována v pufru o složení 50 mM Tris – HCl (pH 7,5), 0,1% SDS, 8 M močovina. Analýzou gelu bylo zjištěno, že protein byl z velké části obsažen v močovinovém extraktu a tedy nerozpustný ve vodě. Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, vzorek před indukcí, doba exprese 4 h, vodný extrakt, močovinový extrakt. Viz **Obrázek 2**.



Obrázek 2 – Test rozpustnosti. Pořadí vzorků: standard, vzorek před indukcí, exprese 4 h, vodný extrakt, močovinový extrakt

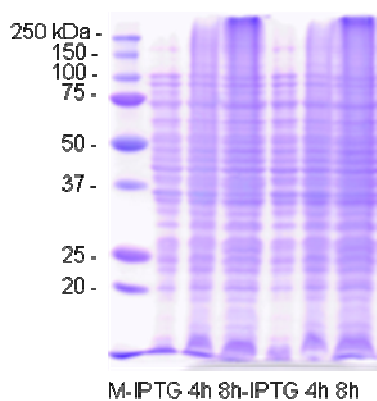
5.3. *Expresse II*

Podmínky: teplota exprese 25 °C, kultivační medium LB,

indukce byla provedena při optické densitě 0,8 (při vlnové délce 600 nm)

5.3.1. Test exprese

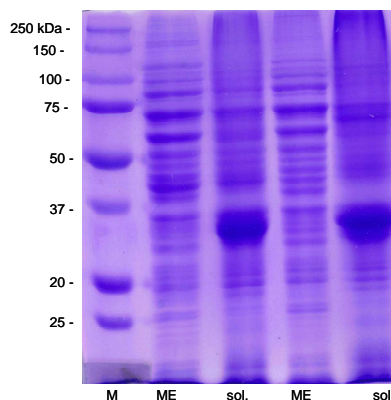
Pro zvýšení frakce proteinu exprimovaného do cytosolu byly upraveny podmínky exprese. Buňky byly kultivovány v 10 ml media LB do optické density 0,8, poté indukovány a exprimovány při 25 °C IPTG ve finální koncentraci 1 mM. Vizualizace gelu SDS-PAGE ukázala, že protein se exprimoval. Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, vzorek bez indukce, doba exprese 4 h, doba exprese 8 h, vzorek bez indukce, doba exprese 4 h, doba exprese 8 h. Viz **Obrázek 3**.



Obrázek 3 – Test exprese. Pořadí vzorků: standard, vzorek před indukcí, exprese 4 h, exprese 8 h, vzorek před indukcí, indukce 4 h, indukce 8 h

5.3.2. Test rozpustnosti

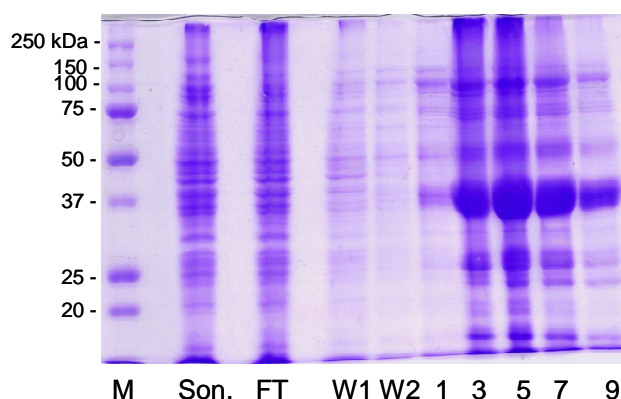
Po změně teploty indukce byla opět testována rozpustnost získaného proteinu. Po odstředění byla biomasa resuspendována v pufru o složení 50 mM Tris – HCl (pH 8,8), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA. Peleta nerozpustná ve vodě byla resuspendována v pufru o složení 50mM Tris – HCl (pH 7,5), 0,1% SDS, 8 M močovina. SDS-PAGE ukázala, že se již exprimovaný protein vyskytuje v cytosolu. Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, močovinový extrakt, vodný extrakt, močovinový extrakt, vodný extrakt. Viz Obrázek 4.



Obrázek 4 – Test rozpustnosti. Pořadí vzorků: standard, močovinný extrakt, vodný extrakt, močovinný extrakt, vodný extrakt

5.3.3. Test afinity

Pro zjištění schopnosti konkrétního proteinu vázat se na matici se provádí test vazby na matici (viz kapitola Metody). Pro niklovou chelatační chromatografii byl použit ekvilibrační pufr o složení 50 mM Tris – HCl (pH 8,8), 300 mM NaCl, 2 mM β -merkaptoethanol a promývací pufr o složení 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 20 mM imidazol. Eluce byla provedena pufrem 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 150 mM imidazol. Na poslední frakci byla zvýšena koncentrace imidazolu na 300 mM. Z testu afinity a jeho výsledku na gelu je vidět, že protein se váže na matici. Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, sonikát, propad, promyv ekvilibrační pufrem, promyv promývacím pufrem, eluované frakce 1, 3, 5, 7, 9. Viz Obrázek 5.



Obrázek 5 – Test vazby na matici. Pořadí vzorků: standard, sonikát, propad, promyv 1, promyv 2, frakce 1, 3, 5, 7, 9

5.4. *Expresa III*

Podmínky: teplota exprese 25 °C, kultivační medium LB,

indukce byla provedena při optické densitě 0,8 (při vlnové délce 600 nm)

resuspendační pufr: 50 mM Tris - HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl

ekvilibrační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

5 mM imidazol

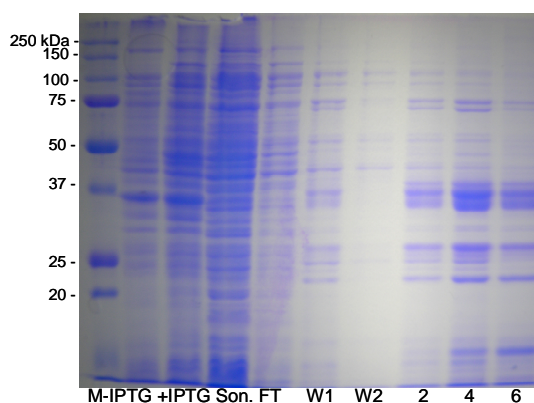
promývací pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

60 mM imidazol

eluční pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

250 mM imidazol

Po zjištění podmínek nutných pro expresi proteinu v rozpustné formě a schopného se vázat na matrici byla provedena exprese ve větším objemu (2 l). Buňky byly kultivovány do optické density 0,8 v mediu LB, indukovány a exprimovány při 25 °C IPTG ve finální koncentraci 1 mM. Ze vzorků před a po indukci nebyl rozeznatelný výtěžek. Centrifugací bylo odstraněno medium LB a pelety resuspendovány v pufru. Dále byla provedena niklová chelatační chromatografie (viz kapitola Metody). Z gelu SDS-PAGE je vidět, že protein se exprimuje i ve větším objemu, ale výtěžek není velký. Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, biomasa bez indukce, doba exprese 16 h, sonikát, propad, promyv ekvilibračním pufrém, promyv promývacím pufrém, eluované frakce 2, 4, 6. Viz **Obrázek 6**.



Obrázek 6 – Expresa III. Pořadí vzorků: standard, biomasa před indukcí, exprese 16 h, sonikát, propad, promyv 1, promyv 2, frakce 2, 4, 6

5.5. *Expresa IV*

Podmínky: teplota exprese 25 °C, kultivační medium TB,

indukce byla provedena při optické densitě 0,8 (při vlnové délce 600 nm)

resuspendační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl

ekvilibrační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

5 mM imidazol

promývací pufr: 50 mM Tris - HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

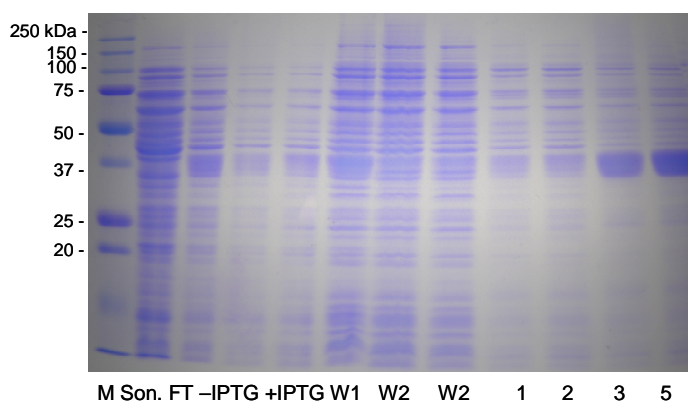
60 mM imidazol

eluční pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

250 mM imidazol

Pro získání signifikantního výtěžku byla exprese v objemu 2 l provedena v mediu s větším obsahem živin (Terrific Broth, TB).

Buňky byly kultivovány do optické density 0,8, indukovány a exprimovány při 25 °C IPTG ve finální koncentraci 1 mM. Medium TB bylo odstraněno centrifugací a pelety resuspendovány. Dále byla provedena niklová chelatační chromatografie (viz kapitola Metody). Z gelu SDS-PAGE po niklové chelatační chromatografii je možné rozpoznat větší výtěžek. Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, sonikát, propad, vzorek bez indukce, doba exprese 16 h, promyv ekvilibračním pufrem, promyv promývacím pufrem, promyv promývacím pufrem, eluované frakce 1, 2, 3, 5. Viz **Obrázek 7**.



Obrázek 7 – Expresa IV. Pořadí vzorků: standard, sonikát, propad, vzorek před indukcí, exprese 16 h, promyv 1 promyv 2, promyv 2, frakce 1, 2, 3, 5

5.6. Expresa V

Podmínky: teplota exprese 25 °C, kultivační medium TB,

indukce byla provedena při optické densitě 1,7 (při vlnové délce 600 nm)

resuspendační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl

ekvilibrační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

5 mM imidazol

promývací pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

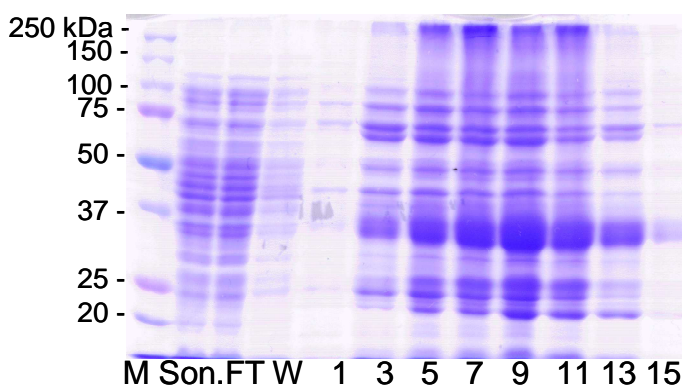
60 mM imidazol

eluční pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

250 mM imidazol

Vzhledem k většímu obsahu živin v TB je možné pěstovat bakterie *E. coli* až do optické density 1,7. Získání vyšší optické density by mohlo zvýšit výtěžek. Expresa probíhala v objemu 2 l.

Buňky byly kultivovány do optické density 1,7 v mediu TB, indukovány a exprimovány při 25 °C IPTG ve finální koncentraci 1 mM. Centrifugací bylo odstraněno medium TB a pelety resuspendovány. Dále byla provedena niklová chelatační chromatografie (viz kapitola Metody). Z gelu SDS-PAGE je vidět, že bylo dosaženo výrazného zlepšení v expresi a většího výtěžku. Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, sonikát, propad, promyv promývacím pufrem, eluované frakce 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15. Viz **Obrázek 8**.



Obrázek 8 – Expresa V. Pořadí vzorků: standard, sonikát, propad, promyv, frakce 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15

5.7. Purifikace I

5.7.1. Niklová chelatační chromatografie

Podmínky: resuspendační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

5 mM imidazol, 1 mM PMSF

ekvilibrační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

5 mM imidazol, 1 mM PMSF

promývací pufr: 50mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

60 mM imidazol

eluční pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

250 mM imidazol

5.7.2 Aniontová-výměnná chromatografie

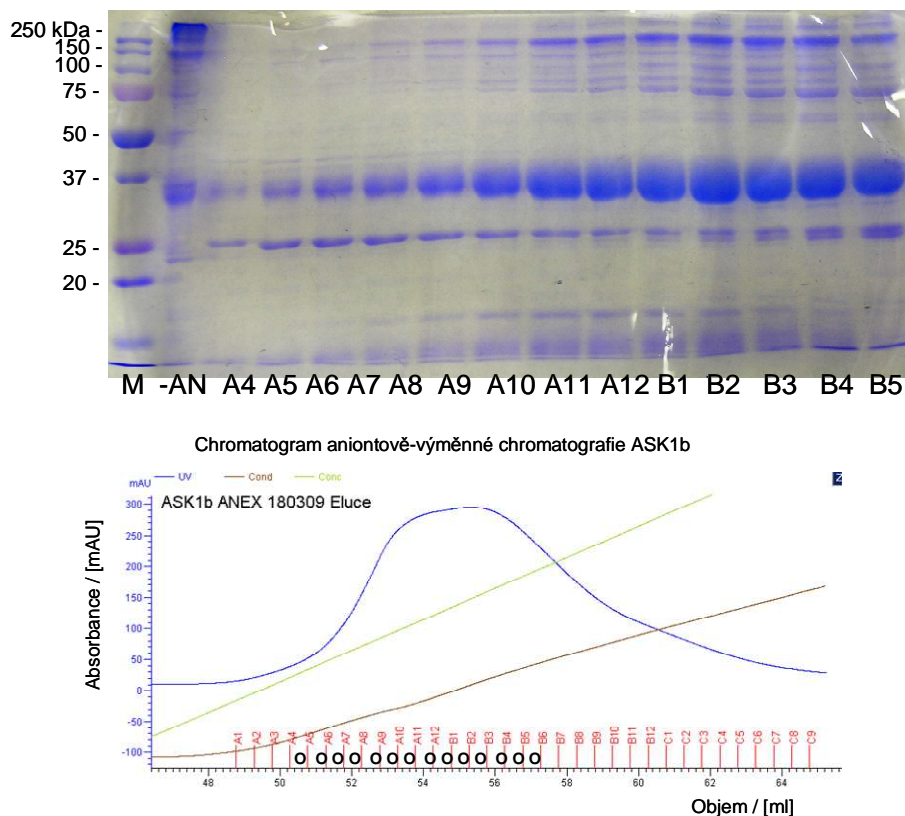
Podmínky: pufr A: 50 mM Tris – HCl (pH 8,3), 20 mM NaCl, 1 mM EDTA,

5 mM DTT

pufr B: 50 mM Tris – HCl (pH 8,3), 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT

Po zjištění optimálních podmínek exprese ve větším objemu byla zahájena samotná purifikace. Po odstranění TB media byly pelety resuspendovány. Imidazol byl přidán pro zlepšení separace při niklové chelatační chromatografii (viz kapitola Metody) a PMSF (inhibitor proteas) má zabránit štěpení ASK1 kinasy nespecifickými proteasami.

Po niklové chelatační chromatografii byly frakce obsahující ASK1 kinasu spojeny a dialýzou převedeny do pufru pro aniontovou-výměnnou chromatografii (viz kapitola Metody). Jímané frakce byly vizualizovány pomocí SDS-PAGE. Po dialýze se objevil degradační produkt, což může být způsobeno zvýšenou aktivitou proteas po snížení koncentrace NaCl v roztoku při dialýze. Dále bylo zjištěno, že aniontová-výměnná chromatografie je v tomto případě jako purifikační krok málo účinná. Degradační produkt byl přítomen ve všech jímaných frakcích. Vzorky byly nanесeny v pořadí standard molekulových vah, vzorek před aniontovou-výměnnou chromatografií, frakce A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, B1, B2, B3, B4, B5. Viz **Obrázek 9**.



Obrázek 9 – Purifikace I. Pořadí vzorků: standard, vzorek před aniontovou-výměnnou HPLC, frakce A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, B1, B2, B3, B4, B5

5.8. Purifikace II

5.8.1. Niklová chelatační chromatografie

Podmínky: resuspendační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

5 mM imidazol, 1 mM PMSF

ekvilibrační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

5 mM imidazol, 1 mM PMSF

promývací pufr: 50mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

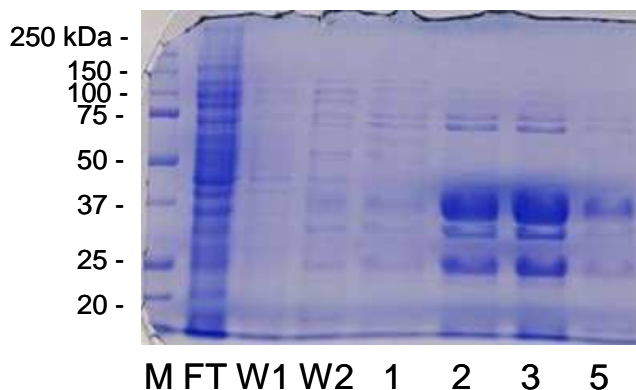
60 mM imidazol

eluční pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

250 mM imidazol

Centrifugací bylo odstraněno medium TB a pelety resuspendovány. Dále byla provedena niklová chelatační chromatografie (viz kapitola Metody). Z gelu SDS-PAGE je vidět, že protein se exprimuje, ale částečně se štěpí už při niklové chelatační chromatografii. Dialýza a neúčinná aniontová-výměnná chromatografie byla vynechána.

Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, propad, promyv ekvilibračním pufrem, promyv promývacím pufrem, eluované frakce 1, 2, 3, 5. Viz **Obrázek 10**.

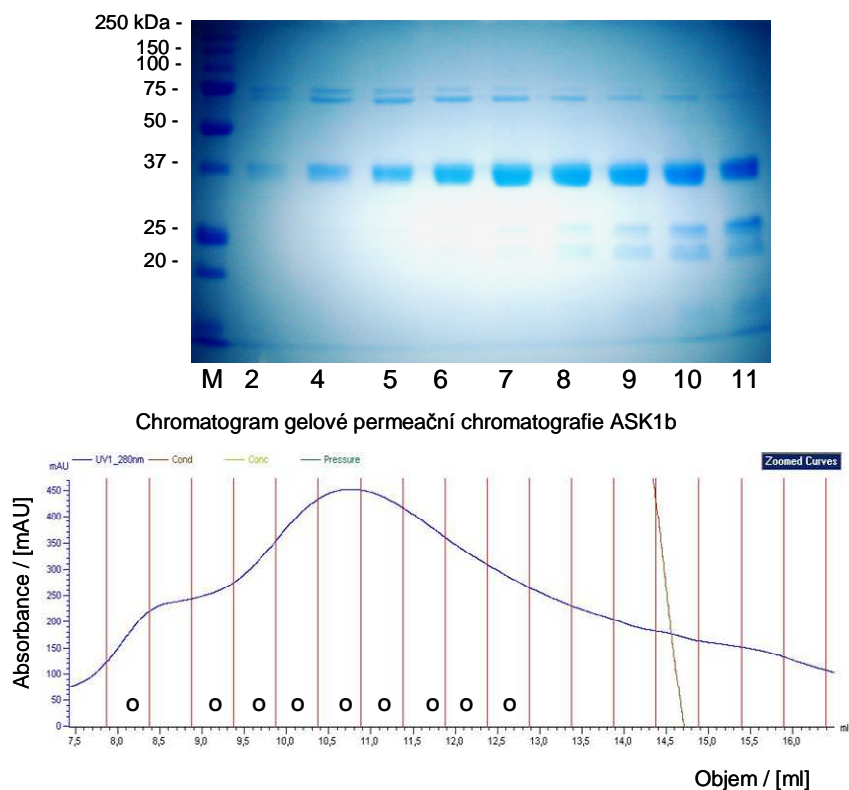


Obrázek 10 – Niklová chelatační chromatografie. Pořadí vzorků: standard, propad, promyv 1, promyv 2, frakce 1, 2, 3, 5

5.8.2. Gelová permeační chromatografie

Podmínky: vodící pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,3), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA,
5% glycerol, 5 mM DTT
kolona Superdex 75

Pro oddělení nečistot, degradačního produktu a agregátu byla použita gelová permeační chromatografie s kolonou Superdex 75 (viz kapitola Metody). Vhodné frakce proteinu po niklové chelatační chromatografii byly spojeny, zkoncentrovány na co nejmenší objem (viz kapitola Metody) a přefiltrovány filtrem s póry 0,45 μm . Vzorek byl nanesen na kolonu a promyt vodícím pufrem. Gel SDS-PAGE ukázal menší stupeň degradace, než v předchozím případě. Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, eluované frakce 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11. Viz **Obrázek 11**.



Obrázek 11 – Gelová permeační chromatografie. Pořadí vzorků: standard, frakce 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11

5.9. Purifikace III

5.9.1. Niklová chelatační chromatografie

Podmínky: resuspendační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

5 mM imidazol, 1 mM PMSF

ekvilibrační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

5 mM imidazol, 1 mM PMSF

promývací pufr: 50mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

60 mM imidazol

eluční pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

250 mM imidazol

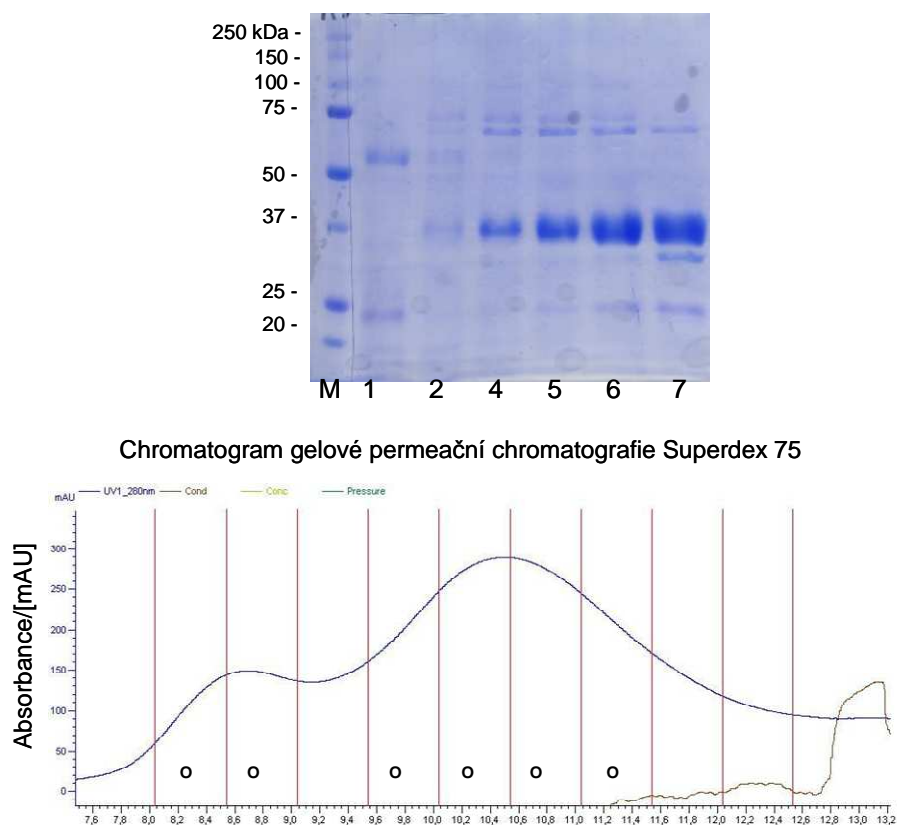
Centrifugací bylo odstraněno medium TB a pelety resuspendovány. Dále byla provedena niklová chelatační chromatografie (viz kapitola Metody). Vzorek proteinu po niklové chelatační chromatografii byl rozdělen na kolony s matricemi pro gelovou permeační chromatografii Superdex 75 a 200.

5.9.2. Gelová permeační chromatografie

Podmínky: vodící pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,3), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA,
5% glycerol, 5 mM DTT

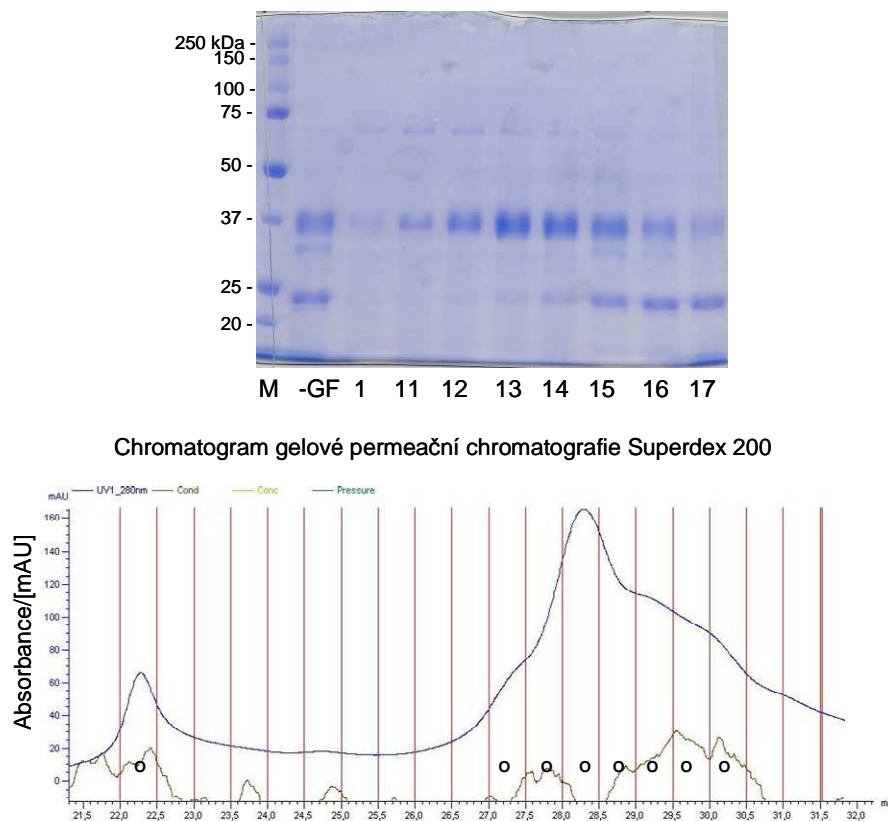
kolona Superdex 75, kolona Superdex 200

Gelová permeační chromatografie byla provedena na dvou kolonách Superdex 75 a Superdex 200 pro porovnání účinnosti separace proteinů. Frakce z niklové chelatační chromatografie byly spojeny, zkoncentrovány na co nejmenší objem (viz kapitola Metody) a přefiltrovány filtrem s póry 0,45 μm . Vzorky byly naneseny na kolony a promyty pufr. Gel SDS-PAGE ukázal lepší oddělení degradačního produktu u kolony Superdex 200 a identický efekt je vidět i na chromatogramu eluce Superdexe 200. Na gelu SDS-PAGE po gelové permeační chromatografii na Superdexe 75 byly vzorky naneseny v pořadí standard molekulových vah, eluované frakce 1, 2, 4, 5, 6, 7. Viz **Obrázek 12**.



Obrázek 12 – Superdex 75. Pořadí vzorků: standard, frakce 1, 2, 4, 5, 6, 7

Na gelu SDS-PAGE po gelové permeační chromatografii na Superdexu 200 byly vzorky nanесeny v pořadí standard molekulových vah, vzorek před gelovou permeační chromatografií, eluované frakce 1, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17. Viz **Obrázek 13**.



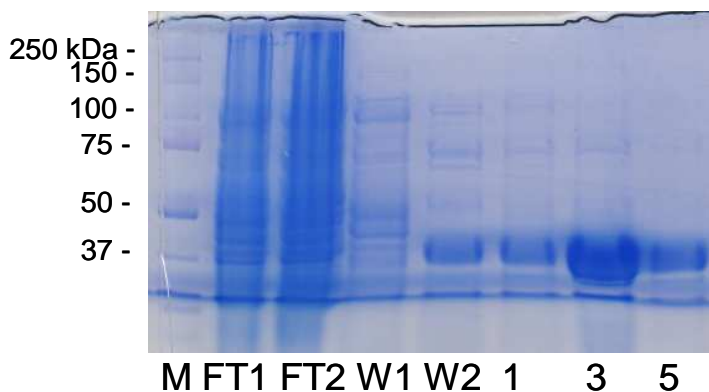
Obrázek 13 – Superdex 200. Pořadí vzorků: standard, frakce 1, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17

5.10. Purifikace IV

5.10.1. Niklová chelatační chromatografie

Podmínky: promytí:	50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA
resuspendační pufr:	50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 2 mM PMSF
ekvilibrační pufr:	50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 1 mM PMSF
promývací pufr:	50mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 60 mM imidazol
eluční pufr:	50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 250 mM imidazol

Centrifugací bylo odstraněno medium TB a pelety resuspendovány v pufru na promytí. Zvýšená koncentrace PMSF a přítomnost EDTA má zabránit nespecifické degradaci ASK1 kinasy¹⁰. EDTA by ale zabránila vazbě proteinu na matrici během niklové chelatační chromatografie, proto byl tento pufr odstraněn centrifugací a pelety resuspendovány. Dále byla provedena niklová chelatační chromatografie (viz kapitola Metody). Z gelu SDS-PAGE je vidět, že degradační produkt významně ubyl. Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, propad ze začátku nanášení, propad z konce nanášení, promyv ekvilibračním pufrem, promyv promývacím pufrem, eluované frakce 1, 3, 5. Viz **Obrázek 14**.



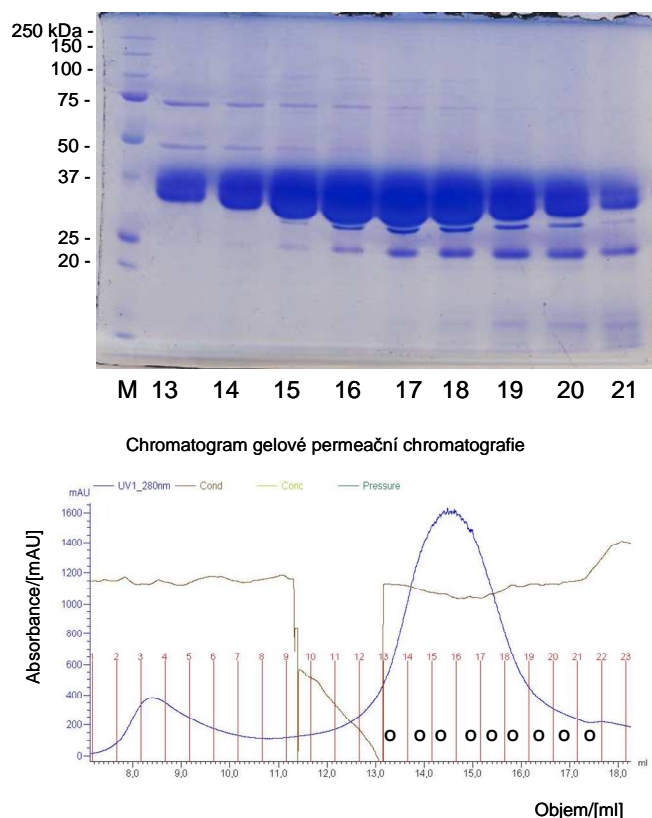
Obrázek 14 – Niklová chelatační chromatografie. Pořadí vzorků: standard, propad 1, propad 2, promyv 1, promyv 2, frakce 1, 3, 5

5.10.2. Gelová permeační chromatografie

Podmínky: vodící pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,3), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA,
5% glycerol, 5 mM DTT

kolona Superdex 200

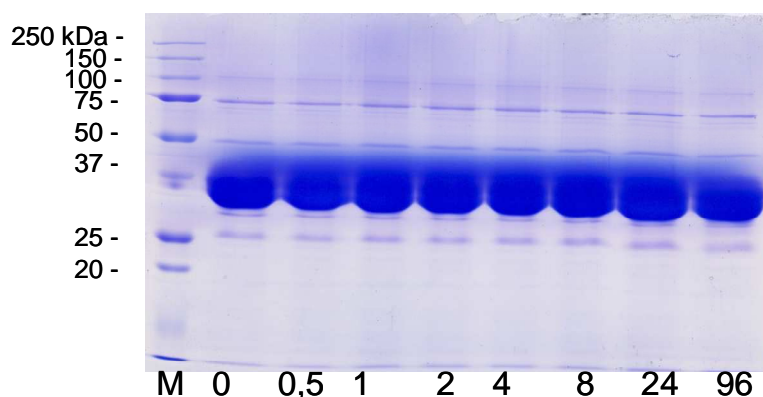
Gelová permeační chromatografie byla provedena na koloně Superdex 200 pro dosažení lepšího rozlišení píků a oddělení agregátu. Frakce z niklové chelatační chromatografie byly spojeny, zkoncentrovány na co nejmenší objem (viz kap. Metody) a přefiltrovány filtrem s póry 0,45 μm . Vzorky byly naneseny na kolonu a promyty pufrem. Gel SDS-PAGE ukázal vypurifikovaný protein s malým množstvím agregátu a chromatogram eluce zobrazuje oddělení nečistoty s větší molekulovou hmotností. Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, eluované frakce 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21. Viz **Obrázek 15**.



Obrázek 15 – Gelová permeační chromatografie. Pořadí vzorků: standard, frakce 13, 14, 15, 16, 14, 18, 19, 20, 21

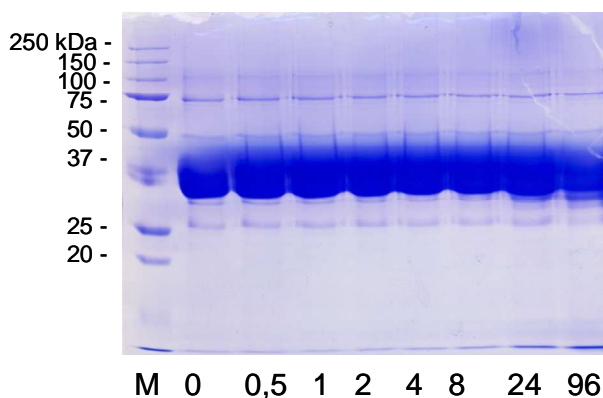
5.11. Test stability

Stabilita proteinkinasy ASK1 byla testována při teplotě 22 a 4 °C. Pro test stability byla použita frakce č. 15. Vzorky byly odebírány v časech 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 96 h a vizualizovány pomocí SDS-PAGE. Při 4 °C je ASK1 kinasa velmi stabilní a při pokojové teplotě je stabilní, mírně naštěpený je až poslední vzorek odebraný po 96 h. Na gel SDS-PAGE byly naneseny vzorky testu stability při 4 °C v pořadí standard molekulových vah, vzorek odebraný po 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 96 h. Viz **Obrázek 16**.



Obrázek 16 – Test stability 4 °C. Pořadí vzorků: standard, 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 96 h

Na gel SDS-PAGE byly naneseny vzorky testu stability při 22 °C v pořadí standard molekulových vah, vzorek odebraný po 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 96 h. Viz **Obrázek 17**.



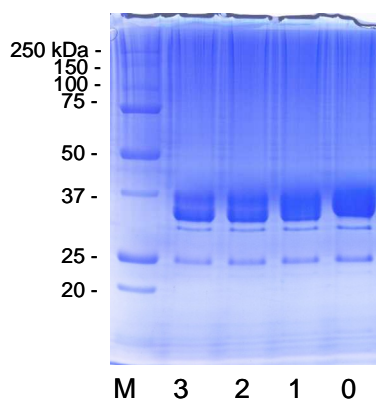
Obrázek 17 – Test stability 22 °C. Pořadí vzorků: standard, 0 h, 1,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 96 h

Koncentrace frakce č. 18 byla stanovena metodou Bradfordové. Pro stanovení koncentrace byla proměřena kalibrační přímka standardu BSA (hovězí sérový albumin). Stanovená koncentrace frakce č. 18 kinasy ASK1 B byla:

$$c = 1,1 \text{ mg/ml}$$

5.13. Štěpení thrombinem

Pro odštěpení histidinové kotvy byla použita proteasa thrombin (viz kapitola Metody). Pro optimální reakci bylo určeno 3 unit/mg ASK1 kinasy. Objem 100 μ l frakce č.18 a 7,2 μ l roztoku thrombinu (0,05 unit/ μ l) bylo inkubováno v mikrozkuhavce při laboratorní teplotě. Vzorky byly odebírány v časech 0 h, 1 h, 2 h, 3 h a vizualizovány pomocí SDS-PAGE. Vzorky byly naneseny v pořadí standard molekulových vah, doba inkubace 3 h, 2 h, 1 h, 0 h. Viz **Obrázek 18**.



Obrázek 18 – Štěpení thrombinem. Pořadí vzorků: standard, 3 h, 2 h, 1 h, 0 h

6. Diskuze

Vývoj purifikačního protokolu exprese a purifikace ASK1 kinasy měl dva hlavní zdroje postupů, informací a podmínek používaných při purifikačních metodách. První byl purifikační protokol používaný pro isoformy proteinů 14-3-3. Druhým zdrojem byl publikovaný postup purifikace stabilního konstrukt ASK1, obsahující aminokyselinové zbytky 659 - 951. Tento konstrukt byl krystalizován¹⁰.

Postup exprese a purifikace je možné rozdělit do několika částí a metod. První část je příprava konstrukt a klonování a byla provedena Mgr. Petrem Váchou. Dále následuje exprese. Exprese se skládá z transformace a kultivace kompetentních bakterií *E. coli*. Následuje samotná indukce exprese. Poté dochází k testu rozpustnosti, pro purifikaci je důležitá rozpustnost proteinu ve vodě, a testu afinity k matici pro niklovou chelatační chromatografii. Použité metody purifikace jsou niklová chelatační chromatografie, aniontová-výměnná chromatografie a gelová permeační chromatografie (viz kapitola Metody). Tento postup byl testován za různých podmínek s těmito proměnnými: teplota exprese, kultivační medium, optická densita a složení pufrů. Teplota exprese byla v rozpětí 25 - 37 °C. Byla použita dvě různá kultivační media Lysogene Broth a Terrific Broth a bakterie byly kultivovány do optické density při vlnové délce 600 nm 0,8 - 1,7. Velký význam mělo složení pufrů, upravována byla koncentrace imidazolu při niklové chelatační chromatografii, koncentrace NaCl a obsah dalších látek inhibujících proteasy jako jsou PMSF a EDTA.

Mgr. Petr Vácha navrhl čtyři konstrukty ASK1 obsahující kinasovou doménu a vazebné místo pro proteiny 14-3-3. Jsou to ASK1 659 - 969, ASK1 659 - 973, ASK1 668 - 969, ASK1 668 - 973. Během vývoje byly podmínky upravovány pro konstrukt ASK1 B (659 - 973) z důvodu exprese v největším množství a dobré stability.

Testy exprese v objemu 10 ml ukázaly optimální teplotu exprese pro získání proteinu ve formě rozpustné ve vodě. Tato teplota byla 25 °C (viz Expresse II). Také se ukázalo, že změna koncentrace IPTG z 0,5 mM na 1 mM či 2 mM nemá velký význam. Další postup vedl k testu afinity, bylo zjištěno, že protein má dobrou afinitu k matici pro niklovou chelatační chromatografii, ale je nutné použít menší koncentrace imidazolu v promývacím a elučním roztoku, než u proteinů 14-3-3. Při promývání pufrům o složení 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 120 mM imidazol docházelo k předčasné eluci ASK1 kinasy. Po úspěšném testu afinity jsem přistoupila k testu exprese v objemu 1 l. Zpočátku probíhala exprese s malým výtěžkem. Proto bylo

změněno kultivační medium z LB na TB. Kultivační medium TB má více živin. Samotná změna media neměla velký vliv na výtěžek exprese, avšak bohatší medium poskytlo možnost kultivovat bakterie do větší optické density 1,7 a tím bylo dosaženo většího výtěžku (viz Expresa III).

Dále bylo zjištěno, že celý proces po skončení kultivace musí probíhat při teplotě 4 °C, což zahrnuje hlavně chlazení kolon při chromatografiích. Přes toto opatření stále docházelo k degradaci produktu během purifikace. Pravděpodobně šlo o rozklad nesespecifickými proteasami. K největší degradaci docházelo při dialýze nutné před aniontovou-výměnnou chromatografií. Dialýza probíhala minimálně 12 h a ukázalo se, že zkrácení procesu purifikace a vysoká koncentrace NaCl zmenší stupeň degradace. Navíc aniontová-výměnná chromatografie nebyla příliš účinná při odstraňování nečistot po niklové chelatační chromatografii (viz Purifikace I). Proto byla tato část z purifikačního protokolu vynechána (dialýza a aniontová-výměnná chromatografie). Nakonec jsem se řídila postupem pro purifikaci krystalizovaného konstruktu ASK1¹⁰ a použila jsem, ihned po kultivaci bakterií a odstranění kultivačního media, promytí pufru o složení 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA. Inhibitor proteas PMSF byl obsažen i v ekvilibračním pufru pro niklovou chelatační chromatografii. EDTA ovšem nemůže v pufru zůstat, protože by rušila vazbu histidinové kotvy na matici niklové chelatační chromatografie. Při gelové permeační chromatografii byla použita kolona Superdex 200, na které byl lépe oddělen agregát od vypurifikovaného proteinu (viz Purifikace IV). Nakonec byla změřena koncentrace získané frakce po gelové permeační chromatografii. Koncentrace frakce č. 18 byla 1,1 mg/ml. Tento výtěžek je dostačující. Ze získané koncentrace ASK1 kinasy byla určena koncentrace thrombinu nutná pro odštěpení His-tagu (viz kapitola Metody). His-tag se podařilo odštěpit. Provedla jsem také test stability vypurifikovaného konstruktu ASK1 B kinasy a to při 4 a 22 °C (viz kapitola Metody). ASK1 B kinasa je po gelové permeační chromatografii velmi stabilní při 4 °C se nerozkládá ani po 96 h a při laboratorní teplotě se rozkládá velmi málo (viz Test stability). Po upravení všech těchto proměnných jsem dospěla k spolehlivému purifikačnímu protokolu konstruktu ASK1 B kinasy, v této práci je uveden ve výsledcích jako Purifikace IV.

7. Závěr

V této diplomové práci bylo dosaženo těchto cílů.

A. Byl optimalizován expresní protokol ASK1 kinasy (659 – 973) s dosažením vysoké reprodukovatelné exprese.

Klíčové podmínky expresního protokolu jsou teplota exprese 25 °C, kultivační medium TB a indukce exprese po dosažení optické density buněčné kultury 1,7 při vlnové délce 600 nm.

B. Byl vyvinut purifikační protokol pro přípravu ASK1 kinasy (659 – 973) v miligramových množstvích rozpustného a stabilního proteinu.

Samotná purifikace je složena ze dvou separačních metod. První metodou je niklová chelatační chromatografie. Složení pufrů pro tuto metodu je

pufr na promytí: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl,

5 mM imidazol, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA

resuspendační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

5 mM imidazol, 2 mM PMSF

ekvilibrační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

5 mM imidazol, 1 mM PMSF

promývací pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

60 mM imidazol

eluční pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl,

250 mM imidazol

Druhou metodou je gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 a se složením vodícího pufru 50 mM Tris – HCl (pH 8,3), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 5 mM DTT.

8. Přílohy

8.1. Příloha 1

Aminokyselinová sekvence proteinu ASK1¹¹²

ATGAGCACGGAGGCGGACGAGGGCATCACTTTCTCTGTGCCACCCTTCGCCCCCTCGGG
--M--S--T--E--A--D--E--G--I--T--F--S--V--P--P--F--A--P--S--G
CTTCTGCACCATCCCCGAGGGCGGCATCTGCAGGAGGGGAGGAGCGGCGGCGGTGGGCGA
--F--C--T--I--P--E--G--G--I--C--R--R--G--G--A--A--A--V--G--E
20
GGGCGAGGAGCACGAGCTGCCACCGCCGCCGCCGGGCAGCTTCTGGAACGTGGAGAGCGC
--G--E--E--H--Q--L--P--P--P--P--P--G--S--F--W--N--V--E--S--A
40
CGCTGCCCTGGCATCGGTTGTCCGGCGGCCACCTCCTCGAGCAGTGCCACCCGAGGCCG
--A--A--P--G--I--G--C--P--A--A--T--S--S--S--S--A--T--R--G--R
60
GGGAGCTCTGTTGGCGGGGGCAGCCGACGGACCACGGTGGCATATGTGATCAACGAAGC
--G--S--S--V--G--G--G--S--R--R--T--T--V--A--Y--V--I--N--E--A
80
GAGCCAAGGGCAACTGGTGGTGGCCGAGAGCGAGGCCCTGCAGAGCTTGCGGGAGGCGTG
--S--Q--G--Q--L--V--V--A--E--S--E--A--L--Q--S--L--R--E--A--C
100
CGAGACAGTGGGCGCCACCCTGGAAACCCTGCATTTTGGGAAACTCGACTTTGGAGAAAC
--E--T--V--G--A--T--L--E--T--L--H--F--G--K--L--D--F--G--E--T
120
CACCGTGCTGGACCGCTTTTACAATGCAGATATTGCGGTGGTGGAGATGAGCGATGCCTT
--T--V--L--D--R--F--Y--N--A--D--I--A--V--V--E--M--S--D--A--F
140
CCGGCAGCCGTCCTTGTTTTACCACCTTGGGGTGAGAGAAAGTTTCAGCATGGCCAACAA
--R--Q--P--S--L--F--Y--H--L--G--V--R--E--S--F--S--M--A--N--N
160
CATCATCTCTACTGTGATACTAACTCGGACTCTCTGCAGTCACTGAAGGAAATAATTG
--I--I--L--Y--C--D--T--N--S--D--S--L--Q--S--L--K--E--I--I--C
180
CCAGAAGAATACTATGTGCACTGGGAACCTACACCTTTGTTCTTACATGATAACTCCACA
--Q--K--N--T--M--C--T--G--N--Y--T--F--V--P--Y--M--I--T--P--H
200
TAACAAAGTCTACTGCTGTGACAGCAGCTTCATGAAGGGGTTGACAGAGCTCATGCAACC
--N--K--V--Y--C--C--D--S--S--F--M--K--G--L--T--E--L--M--Q--P
220
GAAC TTCGAGCTGCTTCTTGGACCCATCTGCTTACCTCTTGTGGATCGTTTTATTCAACT
--N--F--E--L--L--L--G--P--I--C--L--P--L--V--D--R--F--I--Q--L

240

TTTGAAGGTGGCACAAGCAAGTTCTAGCCAGTACTTCCGGGAATCTATACTCAATGACAT
--L--K--V--A--Q--A--S--S--S--Q--Y--F--R--E--S--I--L--N--D--I
260

CAGGAAAGCTCGTAATTTATACACTGGTAAAGAATTGGCAGCTGAGTTGGCAAGAATTCTG
--R--K--A--R--N--L--Y--T--G--K--E--L--A--A--E--L--A--R--I--R
280

GCAGCGAGTAGATAATATCGAAGTCTTGACAGCAGATATTGTCATAAATCTGTTACTTTTC
--Q--R--V--D--N--I--E--V--L--T--A--D--I--V--I--N--L--L--L--S
300

CTACAGAGATATCCAGGACTATGATTCTATTGTGAAGCTGGTAGAGACTTTAGAAAAACT
--Y--R--D--I--Q--D--Y--D--S--I--V--K--L--V--E--T--L--E--K--L
320

GCCAACCTTTGATTTGGCCTCCCATCACCATGTGAAGTTTCATTATGCATTTGCACTGAA
--P--T--F--D--L--A--S--H--H--H--V--K--F--H--Y--A--F--A--L--N
340

TAGGAGAAATCTCCTGGTGACAGAGCAAAAGCTCTTGATATTATGATTCCCATGGTGCA
--R--R--N--L--P--G--D--R--A--K--A--L--D--I--M--I--P--M--V--Q
360

AAGCGAAGGACAAGTTGCTTCAGATATGTATTGCCTAGTTGGTCGAATCTACAAAGATAT
--S--E--G--Q--V--A--S--D--M--Y--C--L--V--G--R--I--Y--K--D--M
380

GTTTTTGGACTCTAATTTACGGACACTGAAAGCAGAGACCATGGAGCTTCTTGGTTCAA
--F--L--D--S--N--F--T--D--T--E--S--R--D--H--G--A--S--W--F--K
400

AAAGGCATTTGAATCTGAGCCAACACTACAGTCAGGAATTAATTATGCGGTCCTCCTCCT
--K--A--F--E--S--E--P--T--L--Q--S--G--I--N--Y--A--V--L--L--L
420

GGCAGCTGGACACCAGTTTGAATCTTCCTTTGAGCTCCGGAAGTTGGGGTGAAGCTAAG
--A--A--G--H--Q--F--E--S--S--F--E--L--R--K--V--G--V--K--L--S
440

TAGTCTTCTTGGTAAAAAGGGAAACTTGGAAAACTCCAGAGCTACTGGGAAGTTGGATT
--S--L--L--G--K--K--G--N--L--E--K--L--Q--S--Y--W--E--V--G--F
460

TTTTCTGGGGGCCAGCGTCCTAGCCAATGACCACATGAGAGTCATTCAAGCATCTGAAAA
--F--L--G--A--S--V--L--A--N--D--H--M--R--V--I--Q--A--S--E--K
480

GCTTTTTTAAACTGAAGACACCAGCATGGTACCTCAAGTCTATTGTAGAGACAATTTTAAT
--L--F--K--L--K--T--P--A--W--Y--L--K--S--I--V--E--T--I--L--I
500

ATATAAGCATTTTGTGAAACTGACCACAGAACAGCCTGTGGCCAAGCAAGAACTTGTGGA
--Y--K--H--F--V--K--L--T--T--E--Q--P--V--A--K--Q--E--L--V--D
520

CTTTTGGATGGATTTCTGCTGAGGCCACAAAGACAGATGTTACTGTGGTTAGGTTTCC
--F--W--M--D--F--L--V--E--A--T--K--T--D--V--T--V--V--R--F--P
540

AGTATTAATATTAGAACCAACCAAAATCTATCAACCTTCTTATTTGTCTATCAACAATGA
--V--L--I--L--E--P--T--K--I--Y--Q--P--S--Y--L--S--I--N--N--E
560

AGTTGAGGAAAGACAATCTCTATTTGGCACGTGCTTCCTGATGACAAGAAAGGTATACA
--V--E--E--K--T--I--S--I--W--H--V--L--P--D--D--K--K--G--I--H
580

TGAGTGGAATTTTAGTGCCTCTTCTGTGTCAGGGGAGTGAGTATTTCTAAATTTGAAGAAAG
--E--W--N--F--S--A--S--S--V--R--G--V--S--I--S--K--F--E--E--R
600

ATGCTGCTTTCTTTATGTGCTTCACAATCTGATGATTTCCAAATCTATTTCTGTACAGA
--C--C--F--L--Y--V--L--H--N--S--D--D--F--Q--I--Y--F--C--T--E
620

ACTTCATTGTAAAAAGTTTTTTGAGATGGTGAACACCATTACCGAAGAGAAGGGGAGAAG
--L--H--C--K--K--F--F--E--M--V--N--T--I--T--E--E--K--G--R--S
640

CACAGAGGAAGGAGACTGTGAAAGTGACTTGCTGGAGTATGACTATGAATATGATGAAAA
--T--E--E--G--D--C--E--S--D--L--L--E--Y--D--Y--E--Y--D--E--N
660

TGGTGACAGAGTCGTTTTAGGAAAAGGCACCTTATGGGATAGTCTACGCAGGTGCGGACTT
--G--D--R--V--V--L--G--K--G--T--Y--G--I--V--Y--A--G--R--D--L
680

GAGCAACCAAGTCAGAATTGCTATTAAGGAAATCCCAGAGAGAGACAGCAGATACTCTCA
--S--N--Q--V--R--I--A--I--K--E--I--P--E--R--D--S--R--Y--S--Q
700

GCCCCCTGCATGAAGAAATAGCATTGCATAAACACCTGAAGCACAAAAATATTGTCCAGTA
--P--L--H--E--E--I--A--L--H--K--H--L--K--H--K--N--I--V--Q--Y
720

TCTGGGCTCTTTTCAGTGAGAATGGTTTCATTAAAATCTTCATGGAGCAGGTCCCTGGAGG
--L--G--S--F--S--E--N--G--F--I--K--I--F--M--E--Q--V--P--G--G
740

AAGTCTTTCTGCTCTCCTTCGTTCCAAATGGGGTCCATTAAAAGACAATGAGCAACAAT
--S--L--S--A--L--L--R--S--K--W--G--P--L--K--D--N--E--Q--T--I
760

TGGCTTTTATACAAAGCAAATACTGGAAGGATTAAAATATCTCCATGACAATCAGATAGT
--G--F--Y--T--K--Q--I--L--E--G--L--K--Y--L--H--D--N--Q--I--V
780

TCACCGGGACATAAAGGGTGACAATGTGTTGATTAATACCTACAGTGGTGTCTCAAGAT
--H--R--D--I--K--G--D--N--V--L--I--N--T--Y--S--G--V--L--K--I
800

CTCTGACTTCGGAACATCAAAGAGGCTTGCTGGCATAAACCCCTGTACTGAAACTTTTAC
--S--D--F--G--T--S--K--R--L--A--G--I--N--P--C--T--E--T--F--T
820

TGGTACCCTCCAGTATATGGCACCAGAAATAATAGATAAAGGACCAAGAGGCTACGGAAA
--G--T--L--Q--Y--M--A--P--E--I--I--D--K--G--P--R--G--Y--G--K
840

AGCAGCAGACATCTGGTCTCTGGGCTGTACAATCATTGAAATGGCCACAGGAAAACCCCC
--A--A--D--I--W--S--L--G--C--T--I--I--E--M--A--T--G--K--P--P
860

ATTTTATGAACTGGGAGAACCACAAGCAGCTATGTTCAAGGTGGGAATGTTTAAAGTCCA
--F--Y--E--L--G--E--P--Q--A--A--M--F--K--V--G--M--F--K--V--H
880

CCCTGAGATCCCAGAGTCCATGTCTGCAGAGGCCAAGGCATTTCATACTGAAATGTTTGA
--P--E--I--P--E--S--M--S--A--E--A--K--A--F--I--L--K--C--F--E
900

ACCAGATCCTGACAAGAGAGCCTGTGCTAACGACTTGCTTGTTGATGAGTTTTTAAAAGT
--P--D--P--D--K--R--A--C--A--N--D--L--L--V--D--E--F--L--K--V
920

TTCAAGCAAAAAGAAAAAGACACAACCTAAGCTTTCAGCTCTTTCAGCTGGATCAAATGA
--S--S--K--K--K--K--T--Q--P--K--L--S--A--L--S--A--G--S--N--E
940

ATATCTCAGGAGTATATCCTTGCCGGTACCTGTGCTGGTGGAGGACACCAGCAGCAGCAG
--Y--L--R--S--I--S--L--P--V--P--V--L--V--E--D--T--S--S--S--S
960

TGAGTACGGCTCAGTTTCACCCGACACGGAGTTGAAAGTGGACCCCTTCTCTTTCAAAC
--E--Y--G--S--V--S--P--D--T--E--L--K--V--D--P--F--S--F--K--T
980

AAGAGCCAAGTCCTGCGGAGAAAGAGATGTCAAGGGAATTCGGACACTCTTTTTGGGCAT
--R--A--K--S--C--G--E--R--D--V--K--G--I--R--T--L--F--L--G--I
1000

TCCAGATGAGAATTTTGAAGATCACAGTGCTCCTCCTTCCCCTGAAGAAAAAGATTCTGG
--P--D--E--N--F--E--D--H--S--A--P--P--S--P--E--E--K--D--S--G
1020

ATTCTTCATGCTGAGGAAGGACAGTGAGAGGCGAGCTACCCTTCACAGGATCCTGACGGA
--F--F--M--L--R--K--D--S--E--R--R--A--T--L--H--R--I--L--T--E
1040

AGACCAAGACAAAATTGTGAGAAACCTAATGGAATCTTTAGCTCAGGGGGCTGAAGAACC
--D--Q--D--K--I--V--R--N--L--M--E--S--L--A--Q--G--A--E--E--P
1060

GAAACTAAAATGGGAACACATCACAAACCCTCATTGCAAGCCTCAGAGAATTTGTGAGATC
--K--L--K--W--E--H--I--T--T--L--I--A--S--L--R--E--F--V--R--S
1080

CACTGACCGAAAAATCATAGCCACCACACTGTCAAAGCTGAAACTGGAGCTGGACTTCGA
--T--D--R--K--I--I--A--T--T--L--S--K--L--K--L--E--L--D--F--D
1100

CAGCCATGGCATTAGCCAAGTCCAGGTGGTACTCTTTGGTTTTCAAGATGCTGTCAATAA
--S--H--G--I--S--Q--V--Q--V--V--L--F--G--F--Q--D--A--V--N--K
1120

AGTTCTTCGGAATCATAACATCAAGCCGCACTGGATGTTTGCCTTAGACAGTATCATTCG
--V--L--R--N--H--N--I--K--P--H--W--M--F--A--L--D--S--I--I--R
1140

GAAGGCGGTACAGACAGCCATTACCATCCTGGTTCCAGAACTAAGGCCACATTTTCAGCCT

--K--A--V--Q--T--A--I--T--I--L--V--P--E--L--R--P--H--F--S--L
1160

TGCATCTGAGAGTGATACTGCTGATCAAGAAGACTTGGATGTAGAAGATGACCATGAGGA
--A--S--E--S--D--T--A--D--Q--E--D--L--D--V--E--D--D--H--E--E
1180

ACAGCCTTCAAATCAAAGTGTCCGAAGACCTCAGGCTGTCATTGAAGATGCTGTGGCTAC
--Q--P--S--N--Q--T--V--R--R--P--Q--A--V--I--E--D--A--V--A--T
1200

CTCAGGCGTGAGCACGCTCAGTTCTACTGTGTCTCATGATTCCCAGAGTGCTCACCGGTC
--S--G--V--S--T--L--S--S--T--V--S--H--D--S--Q--S--A--H--R--S
1220

ACTGAATGTACAGCTTGGAAGGATGAAAATAGAAACCAATAGATTACTGGAAGAATTGGT
--L--N--V--Q--L--G--R--M--K--I--E--T--N--R--L--L--E--E--L--V
1240

TCCGAAAAGAGAAAAGAATTACAAGCACTCCTTCATCGAGCTATTGAAGAAAAAGACCAAGA
--R--K--E--K--E--L--Q--A--L--L--H--R--A--I--E--E--K--D--Q--E
1260

AATTAAACACCTGAAGCTTAAGTCCCAACCCATAGAAATTCCTGAATTGCCTGTATTTCA
--I--K--H--L--K--L--K--S--Q--P--I--E--I--P--E--L--P--V--F--H
1280

TCTAAATTCTTCTGGCACAAATACTGAAGATTCTGAACTTACCGACTGGCTGAGAGTGAA
--L--N--S--S--G--T--N--T--E--D--S--E--L--T--D--W--L--R--V--N
1300

TGGAGCTGATGAAGACACTATAAGCCGGTTTTTGGCTGAAGATTATACACTATTGGATGT
--G--A--D--E--D--T--I--S--R--F--L--A--E--D--Y--T--L--L--D--V
1320

TCTCTACTATGTTACACGTGATGACTTAAAATGCTTGAGACTAAGGGGAGGGATGCTGTG
--L--Y--Y--V--T--R--D--D--L--K--C--L--R--L--R--G--G--M--L--C
1340

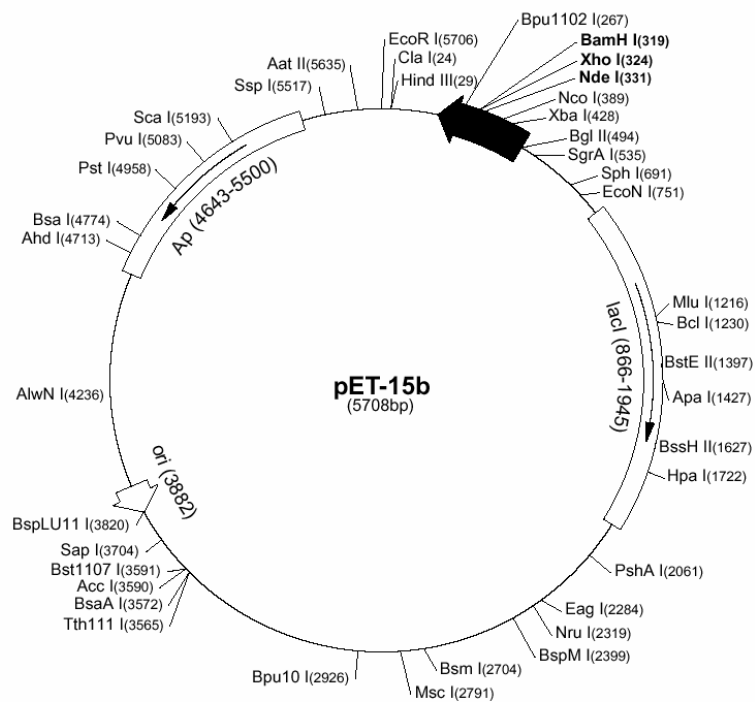
CACACTGTGGAAGGCTATCATTGACTTTGAAACAAACAGACT
--T--L--W--K--A--I--I--D--F--R--N--K--Q--T--
1360

8.2. Příloha 2

Vector pET-15b (Novagen, USA)

pET-15b sequence landmarks

T7 promoter	463-479
T7 transcription start	452
His•Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500



9. Literatura

1. Subramanian R. R., Zhang H., Wang H., Ichijo H., Miyashita T., Fu H. (2004) Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins. *Exp. Cell Res.* **294**, 581-591.
2. Matsukawa J., Matsuzawa A., Takeda K., Ichijo H. (2004) The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *J. Biochem. (Tokyo)* **136**, 261-265.
3. McDonald P.H., Chow C.W., Miller W.E., Laporte S.A., Field M.E., Lin F.T., Davis R.J., Lefkowitz R.J. (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**, 1574-1577.
4. Ichijo H., Nishida E., Irie K., ten Dijke P., Saitoh M., Moriguchi T., Takagi M., Matsumoto K., Miyazono K., Gotoh Y. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**, 90-94.
5. Chen Z., Seimiya H., Naito M., Mashima T., Kizaki A., Dan S., Im-aizumi M., Ichijo H., Miyazono K., Tsuruo T. (1999) ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene* **18**, 173-180.
6. Chibon F., Mariani O., Derre J., Mairal A., Coindre J.M., Guillou L., Sastre X., Pedeutour F., Aurias A. (2004) ASK1 (MAP3K5) as a potential therapeutic target in malignant fibrous histiocytomas with 12q14-q15 and 6q23 amplifications. *Gen. Chrom. Cancer* **40**, 32-37.
7. Hashimoto Y., Niikura T., Chiba T., Tsukamoto E., Kadowaki H., Nishitoh H., Yamagishi Y., Ishizaka M., Yamada M., Nawa M., et al. (2003) The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor causes sustained apoptosis signal-regulating kinase 1/c-Jun NH2-terminal kinase-mediated neurotoxic signal via dimerization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 889-902.
8. Kadowaki H., Nishitoh H., Urano F., Sadamitsu C., Matsuzawa A., Takeda K., Masutani H., Yodoi J., Urano Y., Nagano T., et al. (2005) Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ.* **12**, 19-24.
9. Song S., Kim S.Y., Hong Y.M., Jo D.G., Lee J.Y., Shim S.M., Chung C.W., Seo S.J., Yoo Y.J., Koh J.Y., et al. (2003) Essential role of E2-25K/Hip-2 in mediating amyloid-beta neurotoxicity. *Mol. Cell* **12**, 553-563.
10. Bunkoczi G., Salah E., Filippakopoulos P., Fedorov O., Muller S., Sobott F., Parker S.A., Zhang H., Min W., Turk B.E., Knapp S. (2007) Structural and Functional Characterization of the Human Protein Kinase ASK1. *Structure* **15**, 1215-1226.

-
11. Kariya S., Hirano M., Nagai Y., Furiya Y., Fujikake N., Toda T., Ueno S. (2005) Humanin attenuates apoptosis induced by DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches. *J. Mol. Neurosci.* **25**, 165-169.
 12. Nishitoh H., Matsuzawa A., Tobiume K., Saegusa K., Takeda K., Inoue K., Hori S., Kakizuka A., Ichijo H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* **16**, 1345-1355.
 13. Sekine Y., Takeda K., Ichijo H. (2006) The ASK1-MAP kinase signaling in ER stress and neurodegenerative diseases. *Curr. Mol. Med.* **6**, 87-97.
 14. Tobiume K., Saitoh M., Ichijo H. (2002) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of preformed oligomer. *J. Cell Physiol.* **191**, 95-104.
 15. Noguchi T., Takeda K., Matsuzawa A., Saegusa K., Nakano H., Gohda J., Inoue J., Ichijo H. (2005) Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **280**, 37033-37040.
 16. Saitoh M., Nishitoh H., Fujii M., Takeda K., Tobiume K., Sawada Y., Kawabata M., Miyazono K., Ichijo H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**, 2596-2606.
 17. Liu Y., Min W. (2002) Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ. Res.* **90**, 1259-1266.
 18. Zhang R., Al-Lamki R., Bai L., Streb J.W., Miano J.M., Bradley J., Min W. (2004) Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1 mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circ. Res.* **94**, 1483-1491.
 19. Takekawa M., Tatebayashi K., Saito H. (2005) Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinases. *Mol. Cell* **18**, 295-306.
 20. Aitken A. (2006) 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 162-172.
 21. Wiltfang J., Otto M., Baxter HC., Bodemer M., Steinacker P., Bahn E., Zerr I., Kornhuber J., Kretschmar HA., Poser S., Ruther E., Aitken A. (1999) Isoform pattern of 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurochem.* **73**, 2485-2490.
 22. Mackie S., Aitken A. (2005) Novel brain 14-3-3 interacting proteins involved in neurodegenerative disease. *FEBS J.* **272**, 4202-4210.

-
23. Baxter HC., Liu WG., Forster JL., Aitken A., Fraser JR. (2002) Immunolocalisation of 14-3-3 isoforms in normal and scrapie-infected murine brain. *Neurosci.* **109**, 5-14.
24. Layfield R., Fergusson J., Aitken A., Lowe J., Landon M., Mayer RJ. (1996) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins. *Neurosci. Lett.* **209**, 57-60.
25. Ostrerova N., Petrucelli L., Farrer M., Mehta N., Choi P., Hardy J., Wolozin B. (1999) alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J. Neurosci.* **19**, 5782-5791.
26. Chen HK., Fernandez-Funez P., Acevedo SF., Lam YC., Kaytor MD., Fernandez MH., Aitken A., Skoulakis EM., Orr HT., Botas J., Zoghbi HY. (2003) Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* **113**, 457-468.
27. Waelter S., Boeddrich A., Lurz R., Scherzinger E., Lueder G., Lehrach H., Wanker EE. (2001) Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1393-1407.
28. Ichimura T., Isobe T., Okuyama T., Takahashi N., Araki K., Kuwano R., Takahashi Y. (1988) Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**, 7084-7088.
29. Toker A., Sellers LA., Amess B., Patel Y., Harris A., Aitken A. (1992) Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1/14-3-3) from sheep brain. Amino acid sequence of phosphorylated forms. *Eur. J. Biochem.* **206**, 453-461.
30. Moore BE., Perez VJ., In: Carlson FD., editor. (1967) Physiological and biochemical aspects of nervous integration. *Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall*, 343-359
31. Ichimura T., Isobe T., Okuyama T., Yamauchi T., Fujisawa H. (1987) Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca²⁺, calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett.* **219**, 79-82.
32. Toker A., Ellis CA., Sellers LA., Aitken A. (1990) Protein kinase C inhibitor proteins. Purification from sheep brain and sequence similarity to lipocortins and 14-3-3 protein. *Eur. J. Biochem.* **191**, 421-429.
33. Aitken A., Ellis CA., Harris A., Sellers LA., Toker A. (1990) Kinase and neurotransmitters. *Nature* **344**, 594.
34. Reuther GW., Fu H., Cripe LD., Collier RJ., Pendergast AM. (1994) Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* **266**, 129-133.

-
35. Fantl WJ., Muslin AJ., Kikuchi A., Martin JA., MacNicol AM., Gross RW., Williams LT. (1994) Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature* **371**, 612-614.
36. Fu H., Xia K., Pallas DC., Cui C., Conroy K., Narsimhan RP., Mamon H., Collier RJ., Roberts TM. (1994) Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins. *Science* **266**, 126-129.
37. Freed E., Symons M., Macdonald SG., McCormick F., Ruggieri R. (1994) Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science* **265**, 1713-1716.
38. Liu YC., Elly C., Yoshida H., Bonnefoy-Berard N., Altman A. (1996) Activation-modulated association of 14-3-3 proteins with Cbl in T cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 14591-14595.
39. Honda R., Ohba Y., Yasuda H. (1997) 14-3-3 zeta protein binds to the carboxyl half of mouse wee1 kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 262-265.
40. Fanger GR., Widmann C., Porter AC., Sather S., Johnson GL., Vaillancourt RR. (1998) 14-3-3 proteins interact with specific MEK kinases. *J. Biol. Chem.* **273**, 3476-3483.
41. Todd A., Cossons N., Aitken A., Price GB., Zannis-Hadjopoulos M. (1998) Human cruciform binding protein belongs to the 14-3-3 family. *Biochem.* **37**, 14317-14325.
42. Pozuelo Rubio M., Geraghty KM., Wong BH., Wood NT., Campbell DG., Morrice N., Mackintosh C. (2004) 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem. J.* **379**, 395-408.
43. Jin J., Smith FD., Stark C., Wells CD., Fawcett JP., Kulkarni S., Metalnikov P., O'Donnell P., Taylor P., Taylor L., Zougman A., Woodgett JR., Langeberg LK., Scott JD., Pawson T. (2004) Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr. Biol.* **14**, 1436-1450.
44. Meek SE., Lane WS., Piwnica-Worms H. (2004) Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 32046-32054.
45. Benzinger A., Muster N., Koch HB., Yates JR. 3rd, Hermeking H. (2005) Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. *Mol. Cell Proteom.* **4**, 785-795.
46. Muller J., Ory S., Copeland T., Piwnica-Worms H., Morrison DK. (2001) C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol. Cell* **8**, 983-993.
47. Ory S., Zhou M., Conrads TP., Veenstra TD., Morrison DK. (2003) Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr. Biol.* **13**, 1356-1364.

-
48. Baisamy L., Jurisch N., Diviani D. (2005) Leucine zipper-mediated homo-oligomerization regulates the Rho-GEF activity of AKAP-Lbc. *J. Biol. Chem.* **280**, 15405-15412.
49. van Hemert MJ., Steensma HY., van Heusden GP. (2001) 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* **23**, 936-946.
50. Rosenquist M., Sehnke P., Ferl RJ., Sommarin M., Larsson C. (2000) Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *J. Mol. Evol.* **51**, 446-458.
51. Aitken A. (2002) Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. *Plant Mol. Biol.* **50**, 993-1010.
52. Martin H., Patel Y., Jones D., Howell S., Robinson K., Aitken A. (1993) Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein. An antibody specific for the N-acetylated amino-terminus of a protein. *FEBS Lett.* **331**, 296-303.
53. Aitken A. (1999) Protein consensus sequence motifs. *Mol. Biotechnol.* **12**, 241-253.
54. Das AK., Cohen PW., Barford D. (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* **17**, 1192-1199.
55. Fukuhara N., Ebert J., Unterholzner L., Lindner D., Izaurralde E., Conti E. (2005) SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell* **17**, 537-547.
56. Xiao B., Smerdon SJ., Jones DH., Dodson GG., Soneji Y., Aitken A., Gamblin SJ. (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* **376**, 188-191.
57. Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier RJ., Fu H., Liddington R. (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* **376**, 191-194.
58. Muslin AJ., Tanner JW., Allen PM., Shaw AS. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889-897.
59. Yaffe MB., Rittinger K., Volinia S., Caron PR., Aitken A., Leffers H., Gamblin SJ., Smerdon SJ., Cantley LC. (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961-971.
60. Ganguly S., Weller JL., Ho A., Chemineau P., Malpoux B., Klein DC. (2005) Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**, 1222-1227.
61. Shikano S., Coblitz B., Sun H., Li M. (2005) Genetic isolation of transport signals directing cell surface expression. *Nat. Cell Biol.* **7**, 985-992.

-
62. Coblitz B., Shikano S., Wu M., Gabelli SB., Cockrell LM., Spieker M., Hanyu Y., Fu H., Amzel LM., Li M. (2005) C-terminal recognition by 14-3-3 proteins for surface expression of membrane receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 36263-36272.
63. Rittinger K., Budman J., Xu J., Volinia S., Cantley LC., Smerdon SJ., Gamblin SJ., Yaffe MB. (1999) Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol. Cell* **4**, 153-166.
64. Obsil T., Ghirlando R., Klein DC., Ganguly S., Dyda F. (2001) Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. A role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* **105**, 257-267.
65. Dubois T., Rommel C., Howell S., Steinhussen U., Soneji Y., Morrice N., Moelling K., Aitken A. (1997) 14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site in vivo regulates Raf/14-3-3 interaction. *J. Biol. Chem.* **272**, 28882-28888.
66. Tzivion G., Luo Z., Avruch J. (1998) A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* **394**, 88-92.
67. Masters SC., Fu H. (2001) 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *J. Biol. Chem.* **276**, 45193-45200.
68. Petosa C., Masters SC., Bankston LA., Pohl J., Wang B., Fu H., Liddington RC. (1998) 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J. Biol. Chem.* **273**, 16305-16310.
69. Waterman MJ., Stavridi ES., Waterman JL., Halazonetis TD. (1998) ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat. Genet.* **19**, 175-178.
70. Mackintosh C. (2004) Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem. J.* **381**, 329-342.
71. Wilker E., Yaffe MB. (2004) 14-3-3 Proteins a focus on cancer and human disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* **37**, 633-642.
72. Koivunen J., Aaltonen V., Peltonen J. (2006) Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Lett.* **235**, 1-10.
73. Jones DH., Martin H., Madrazo J., Robinson KA., Nielsen P., Roseboom PH., Patel Y., Howell SA., Aitken A. (1995) Expression and structural analysis of 14-3-3 proteins. *J. Mol. Biol.* **245**, 375-384.
74. Braselmann S., McCormick F. (1995) Bcr and Raf form a complex in vivo via 14-3-3 proteins. *EMBO J.* **14**, 4839-4848.

-
75. Ma Y., Pitson S., Hercus T., Murphy J., Lopez A., Woodcock J. (2005) Sphingosine activates protein kinase A type II by a novel cAMP-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **280**, 26011-26017.
76. Woodcock JM., Murphy J., Stomski FC., Berndt MC., Lopez AF. (2003) The dimeric versus monomeric status of 14-3-3zeta is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface. *J. Biol. Chem.* **278**, 36323-36327.
77. Bellacosa A., Kumar CC., Di Cristofano A., Testa JR. (2005) Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv. Cancer Res.* **94**, 29-86.
78. Powell DW., Rane MJ., Chen Q., Singh S., McLeish KR. (2002) Identification of 14-3-3zeta as a protein kinase B/Akt substrate. *J. Biol. Chem.* **277**, 21639-21642.
79. Tsuruta F., Sunayama J., Mori Y., Hattori S., Shimizu S., Tsujimoto Y., Yoshioka K., Masuyama N., Gotoh Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* **23**, 1889-1899.
80. Sunayama J., Tsuruta F., Masuyama N., Gotoh Y. (2005) JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J. Cell Biol.* **170**, 295-304.
81. Yoshida K., Yamaguchi T., Natsume T., Kufe D., Miki Y. (2005) JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **7**, 278-285.
82. Aitken A., Howell S., Jones D., Madrazo J., Patel Y. (1995) 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF. *J. Biol. Chem.* **270**, 5706-5709.
83. Ren R. (2005) Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 172-183.
84. Clokie SJ., Cheung KY., Mackie S., Marquez R., Peden AH., Aitken A. (2005) BCR kinase phosphorylates 14-3-3 Tau on residue 233. *FEBS J.* **272**, 3767-3776.
85. Obsilova V., Herman P., Vecer J., Sulc M., Teisinger J., Obsil T. (2004) 14-3-3zeta C-terminal stretch changes its conformation upon ligand binding and phosphorylation at Thr232. *J. Biol. Chem.* **279**, 4531-4540.
86. Bonnefoy-Bérard N., Liu YC., von Willebrand M., Sung A., Elly C., Mustelin T., Yoshida H., Ishizaka K., Altman A. (1995) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 10142-10146.
87. Fu H., Subramanian RR., Masters SC., (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 617-647.
88. Muslin AJ., Xing H. (2000) 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal* **12**, 703-709.

-
89. Tobiume K., Matsuzawa A., Takahashi T., Nishitoh H., Morita K., Takeda K., Minowa O., Miyazono K., Noda T., Ichijo H. (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* **2**, 222-228.
90. Kim AH., Khursigara G., Sun X., Franke TF., Chao MV. (2001) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 893-901.
91. Zhang L., Chen J., Fu H. (1999) Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 8511-8515.
92. Goldman EH., Chen L., Fu H. (2004) Activation of Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 by Reactive Oxygen Species through Dephosphorylation at Serine 967 and 14-3-3 Dissociation. *J. Biol. Chem.* **279**, 10442-10449.
93. Matsuzawa A., Ichijo H. (2008) Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochem. et Biophys. Acta* **1780**, 1325-1336.
94. Chang L., Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
95. Kyriakis JM., Avruch J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**, 807-869.
96. Cuevas BD., Abell AN., Johnson GL. (2007) Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene* **26**, 3159-3171.
97. Tibbles LA., Woodgett JR. (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 1230-1254.
98. Matsuzawa A., Ichijo H. (2001) Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. *J. Biochem.* **130**, 1-8.
99. Borsello T., Clarke PG., Hirt L., Vercelli A., Repici M., Schorderet DF., Bogousslavsky J., Bonny C. (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat. Med.* **9**, 1180-1186.
100. Dolado I., Swat A., Ajenjo N., De Vita G., Cuadrado A., Nebreda AR. (2007) p38 MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* **11**, 191-205.
101. Adler V., Yin Z., Fuchs SY., Benezra M., Rosario L., Tew KD., Pincus MR., Sardana M., Henderson CJ., Wolf CR., Davis RJ., Ronai Z. (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* **18**, 1321-1334.
102. Matsuzawa A., Nishitoh H., Tobiume K., Takeda K., Ichijo H. (2002) Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxid. Redox Signal.* **4**, 415-425.

-
103. Kamata H., Honda S., Maeda S., Chang L., Hirata H., Karin M. (2005) Reactive oxygen species promote TNF-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**, 649-661.
104. Pastorino L., Sun A., Lu PJ., Zhou XZ., Balastik M., Finn G., Wulf G., Lim J., Li SH., Li X., Xia W., Nicholson LK., Lu KP. (2006) The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid- β production. *Nature* **440**, 528-534.
105. Pinton P., Rimessi A., Marchi S., Orsini F., Migliaccio E., Giorgio M., Contursi C., Minucci S., Mantovani F., Wieckowski MR., Del Sal G., Pelicci PG., Rizzuto R. (2007) Protein kinase C β and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science* **315**, 659-663.
106. Morita K., Saitoh M., Tobiume K., Matsuura H., Enomoto S., Nishitoh H., Ichijo H. (2001) Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J.* **20**, 6028-6036.
107. Noguchi T., Takeda K., Matsuzawa A., Saegusa K., Nakano H., Gohda J., Inoue J., Ichijo H. (2005) Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **280**, 37033-37040.
108. Fujino G., Noguchi T., Takeda K., Ichijo H. (2006) Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 427-435.
109. Fujino G., Noguchi T., Matsuzawa A., Yamauchi S., Saitoh M., Takeda K., Ichijo H. (2007) Thioredoxin and TRAF family proteins regulate ROS-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8152-8163.
110. Nishitoh H., Saitoh M., Mochida Y., Takeda K., Nakano H., Rothe M., Miyazono K., Ichijo H. (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol. Cell* **2**, 389-395.
111. Matsuzawa A., Saegusa K., Noguchi T., Sadamitsu C., Nishitoh H., Nagai S., Koyasu S., Matsumoto K., Takeda K., Ichijo H. (2005) ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat. Immunol.* **6**, 587-592.
112. www.ensembl.org